

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**HİDROJEN PEROKSİT İLE İNDÜKLENMİŞ BEAS-2B
HÜCRELERİNDE YENİ SENTEZLENEN BENZİMİDAZOL TÜREVİ
BİLEŞİĞİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE UPR
SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ
Aysel ERASLAN ŞAKAR

Danışman
Doç.Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

HATAY – 2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**HİDROJEN PEROKSİT İLE İNDÜKLENMİŞ BEAS-2B
HÜCRELERİNDE YENİ SENTEZLENEN BENZİMİDAZOL TÜREVİ
BİLEŞİĞİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE UPR
SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ
Aysel ERASLAN ŞAKAR

Danışman
Doç.Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
16800 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**HİDROJEN PEROKSİT İLE İNDÜKLENMİŞ BEAS-2B
HÜCRELERİNDE YENİ SENTEZLENEN BENZİMİDAZOL TÜREVİ
BİLEŞİĞİN ENDOPLAZMIK RETİKULUM STRESİ VE UPR
SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

Doktora Tezi
Aysel ERASLAN ŞAKAR

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 05/08/2019 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı : Prof.Dr. Abdullah ARPACI
Üye : Prof.Dr. Ayşe YILDIRIM
Üye : Prof.Dr. Miriş DİKMEN
Üye : Doç.Dr. Meral URHAN KÜÇÜK
Üye : Dr.Öğr.Üyesi Ebru DERİCİ EKER

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Anabilim Dalında
hazırlanmıştır.

05/08/2019

Prof.Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tez çalışmalarım esnasında desteğini gördüğüm, öneri ve eleştirileri ile beni yönlendiren değerli danışmanım sayın Doç.Dr. Meral URHAN KÜÇÜK'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyokimya ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Cem ABİDOĞLU'na,

Çalışmaya mali destek veren Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne (16800) ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Deneylerde kullandığımız benzimidazol türevi bileşiği sentezleyen Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi sayın Prof.Dr. Öztekin ALGÜL'e,

Her zaman öğretici ve hoşgörülü yaklaşımlarıyla beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı öğretim üyeleri olan değerli hocalarım sayın Prof.Dr. Fuat ODABAŞIOĞLU ve Dr.Öğr.Üyesi Sema ALAŞAHAN'a

İhtiyacım olan her anımda yanımda olduklarını bildiğim kıymetli arkadaşlarım Nurdan COŞKUN ÇETİN ve Zuhal GÜNDÜZ'e,

Tüm bu zahmetli süreçte destek ve yardımlarını devamlı üzerimde hissettiğim, evlatları olmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum sevgili aileme,

Sevgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen, sabırla, her daim destek olan can eşim Hakan ŞAKAR'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET	XIII
ABSTRACT	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnsan Solunum Epiteli	3
2.1.1. Solunum Epitelinin Yapısı	4
2.1.1.1. Bazal Hücreler	6
2.1.1.2. Salgı Hücreleri	7
2.1.1.3. Silya Hücreleri	7
2.1.2. Solunum Epitelinin Fonksiyonu	8
2.1.3. Solunum Epiteli Hastalıkları	9
2.1.3.1. Astım	9
2.1.3.2. Kistik Fibrozis (KF)	10
2.1.3.3. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH)	10
2.1.3.3.1. KOAH'ta Risk Faktörleri	11
2.1.3.3.1.1. Sigara	12
2.1.3.3.1.2. Mesleki Maruziyet	13
2.1.3.3.1.3. Alfa-1 Antitripsin (AAT) Eksikliği	13
2.1.3.3.1.4. Hava Kirliliği	13
2.1.3.3.1.5. Yaş ve Cinsiyet	14
2.1.3.3.1.6. Sosyoekonomik Durum	14
2.1.4. Oksidatif Stres	14

2.1.4.1. Oksidatif Stres-KOAH İlişkisi	16
2.1.5. ER Stresi	16
2.1.5.1. Oksidatif Stres-ER Stresi İlişkisi	21
2.1.5.2. KOAH-ER Stresi İlişkisi	21
2.1.6. Benimidazoller	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. GEREÇ	24
3.1.1. Hücre Hattı	24
3.1.2. Kimyasallar	24
3.1.3. Cihazlar	25
3.1.4. Ticari Kitler	26
3.2. YÖNTEM	27
3.2.1. Hücre Kültürü	27
3.2.2. Hücre Sayımı	28
3.2.3. Hidrojen Peroksitin ve Benimidazol Türevi Bileşiğin Süspansiyonlarının Hazırlanması	29
3.2.4. Hücre Canlılığı Analizi	29
3.2.5. Biyokimyasal Analizler	30
3.2.5.1. Malondialdehit (MDA) Analizi	30
3.2.5.2. MDA Standart Eğrisi	30
3.2.5.3. Total Protein Ölçümü	31
3.2.6. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	32
3.2.6.1. RNA İzolasyonu	33
3.2.6.2. cDNA Sentezi	34
3.2.7. Real-time PCR	35
3.2.8. Western Blot Analizi	36
3.2.8.1. Protein İzolasyonu	36
3.2.8.2. Protein Konsantrasyonunun Ölçümü	36
3.2.8.2.1. BSA Standartlarının Ölçümü	36
3.2.8.2.2. Total Protein Ölçümü	37
3.2.8.3. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ve Proteinlerin Transferi	37
3.2.8.3.1. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)	37

3.2.8.3.2. Proteinlerin Transferi	38
3.2.8.4. Ponceau S Boyama	38
3.2.8.5. Bloklama	38
3.2.8.6. Birincil Antikor	38
3.2.8.7. İkincil Antikor	39
3.2.8.8. Görüntüleme	39
3.2.9. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	41
4.1. Hücre Canlılığı Analizi	41
4.2. Biyokimyasal Analizler	44
4.2.1. Malondialdehit (MDA) Analizi	44
4.3. Gen Ekspresyon Analizi	45
4.4. Western Blot Analizi	49
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ	63
7. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	İnsan solunum yolunun yapısı	4
Şekil 2.2.	Solunum epitelinde yer alan hücre tipleri	6
Şekil 2.3.	KOAH ile ilişkili risk faktörleri	12
Şekil 2.4.	Katlanmamış protein cevabının üç yolağı	18
Şekil 2.5.	1H-benzimidazol yapısı	22
Şekil 3.1.	BEAS-2B hücre morfolojisi	27
Şekil 3.2.	Thoma lamı	28
Şekil 3.3.	Thoma lamında hücre sayımı yapılan alan	28
Şekil 3.4.	MDA standart eğrisi	31
Şekil 4.1.	H ₂ O ₂ 'nin (24 saat) BEAS-2B hücre canlılığı üzerine etkisi	41
Şekil 4.2.	H ₂ O ₂ 'nin (48 saat) BEAS-2B hücre canlılığı üzerine etkisi	42
Şekil 4.3.	RHE-231'in BEAS-2B hücre canlılığı üzerine etkisi	43
Şekil 4.4.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA düzeyleri	44
Şekil 4.5.	β-aktin primerine ait melting curve eğrisi	46
Şekil 4.6.	IRE1α ve GRP78 primerlerine ait melting curve eğrileri	46
Şekil 4.7.	PERK ve ATF6 primerlerine ait melting curve eğrileri	46
Şekil 4.8.	H ₂ O ₂ (10 µM, 20 µM, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231 (5 µM, 10 µM, 24 saat)'in PERK, ATF6, IRE1α ve GRP78 gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi	47
Şekil 4.9.	H ₂ O ₂ (10 µM, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231 (5 µM, 10 µM, 24 saat)'in PERK, ATF6, IRE1α ve GRP78 gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi	48
Şekil 4.10.	H ₂ O ₂ (20 µM, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231 (5 µM, 10 µM, 24 saat)'in PERK, ATF6, IRE1α ve GRP78 gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi	48
Şekil 4.11.	Proteinlerin transfer edildiği membranın Ponceau S ile görüntülenmesi	49
Şekil 4.12.	H ₂ O ₂ (24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in ATF4 proteini üzerine etkisi	50

Şekil 4.13. H ₂ O ₂ (10 µM, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in ATF4 proteini üzerine etkisi	50
Şekil 4.14. H ₂ O ₂ (20 µM, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in ATF4 proteini üzerine etkisi	51
Şekil 4.15. H ₂ O ₂ (24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in IRE1α proteini üzerine etkisi	51
Şekil 4.16. H ₂ O ₂ (10 µM, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in IRE1α proteini üzerine etkisi	52
Şekil 4.17. H ₂ O ₂ (20 µM, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in IRE1α proteini üzerine etkisi	52



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan çözelti ve kimyasal maddeler	24
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan cihazlar	25
Çizelge 3.3.	Çalışmada kullanılan ticari kitler	27
Çizelge 3.4.	Çalışmada kullanılan primerler	35
Çizelge 3.5.	Çalışmada kullanılan birincil antikorlar	39
Çizelge 4.1.	H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde % canlılık değerleri ...	42
Çizelge 4.2.	RHE-231 bileşiğine maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde % canlılık değerleri	43
Çizelge 4.3.	10 µM konsantrasyonda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi tanımlayıcı verileri	45
Çizelge 4.4.	20 µM konsantrasyonda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi tanımlayıcı verileri	45
Çizelge 4.5.	H ₂ O ₂ (10 µM, 20 µM, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde PERK, ATF6, IRE1α ve GRP78 genlerine ait kat değişimi ve p değerleri	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

•OH	: Hidroksil radikali
AAT	: Alfa-1 antitripsin
AP-1	: Aktivator protein 1
ATCC	: American type culture collection
ATF4	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
ATF6	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
ATF6N	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6'nın sitozolik fragmenti
BCA	: Bicinchoninic acid
BEAS-2B	: İnsan bronş epitel hücre hattı
BiP	: İmmünoglobulin bağlayıcı protein
bZIP	: Bazik lösin fermuar
Ca ²⁺	: Kalsiyum
cDNA	: Komplementer DNA
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran regülatör
CHOP	: CCAAT güçlendirici bağlayıcı protein C/EBP homolog protein
CO ₂	: Karbon dioksit
DMEM	: Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
eIF2 α	: Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: ER-ilişkili protein degradasyonu
FBS	: Fetal bovine serum
g	: Gravity
GADD34	: DNA hasarı ile tetiklenebilir protein 34
GLS1	: Golgi lokalizasyon sekans 1
GLS2	: Golgi lokalizasyon sekans 2
GOLD	: Global initiative for chronic obstructive lung disease
GRP78	: Glukoz düzenleyici protein 78
GSH	: Glutatyon

H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HBSS	: Hank's balanced salt solution
HO•	: Hidroksil radikali
HO ₂ •	: Perhidroksil radikali
HOCl	: Hipokloröz asit
Hsp70	: Isı şok proteini 70
IgA	: İmmünoglobulin A
IKK	: İkB kinaz
IL-8	: İnterlökin 8
IRE1	: İnositol gerektiren enzim 1
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
KF	: Kistik fibrozis
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LTB ₄	: Lökotrien B ₄
MDA	: Malondialdehit
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	: Nüklear faktör-κB
Nrf2	: Nüklear faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
O ₂ • ⁻	: Süperoksit anyon radikali
°C	: Santigrat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: Phosphate bufffered saline
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PERK	: Protein kinaz benzeri ER kinaz
RIPA	: Radioimmunoprecipitation assay
ROS	: Reaktif oksijen türleri
S1P	: Proteaz bölgesi 1
S2P	: Proteaz bölgesi 2
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
TBA	: Thiobarbituric acid

TNF α	: Tumor nekroz faktör α
TRAF2	: TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2
UPR	: Katlanmamış protein cevabı
XBP1	: X-kutusu bağlayıcı protein 1
XBP1s	: X-kutusu bağlayıcı protein 1'in splayed edilmiş formu



ÖZET

Hidrojen Peroksit ile İndüklenmiş BEAS-2B Hücrelerinde Yeni Sentezlenen Benzimidazol Türevi Bileşiğin Endoplazmik Retikulum Stresi ve UPR Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi

Solunum epiteli solunumla alınan zararlı partiküller ve enfeksiyon ajanlarına karşı ilk savunma bariyerini oluşturur. Solunum epitel hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stres, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi kronik solunum yolu hastalıklarının patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır.

Bu tez çalışmasında, insan bronş epitel hücre hattı olan BEAS-2B hücrelerinde oksidatif stres koşulları altında, endoplazmik retikulum (ER) stresinin katlanmamış protein cevabı (UPR)'nin hangi yolağı üzerinden gerçekleştiğinin ve yeni sentezlenen benzimidazol türevi bileşiğin (RHE-231) ER stresi ve UPR sinyal yolağında koruyucu bir etkisinin olup olmadığının gen ve protein düzeyinde aydınlatılması amaçlandı. Bu doğrultuda, BEAS-2B hücreleri farklı konsantrasyonlar (0-200 μM) ve sürelerde (24 ve 48 saat) hidrojen peroksit (H_2O_2)'ye maruz bırakılarak uygun konsantrasyonlar (10 ve 20 μM) ve süre (24 saat) belirlendikten sonra oksidatif hasarlı hücre modeli oluşturuldu. Daha sonra BEAS-2B hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0-100 μM) RHE-231'e 24 saat süresince maruz bırakılarak uygun konsantrasyonlar (5 ve 10 μM) belirlendi.

Çalışmada, oksidatif hasarlı hücre modeli, malondialdehit (MDA) düzeyinin spektrofotometrik ölçümüyle teyit edildi. 24 saat süresince 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA düzeyi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu (10 μM konsantrasyonda $p=0.000$; 20 μM konsantrasyonda $p=0.000$). UPR yolağı parametrelerinden, IRE1 α (20 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231 konsantrasyonda 11.95 kat $p=0.026$; 20 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231 konsantrasyonda 14.31 kat $p=0.000037$), PERK (20 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231 konsantrasyonda 3.65 kat $p=0.032$; 20 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231 konsantrasyonda 39.27 kat $p=0.012$) gen ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı gözlenirken, ATF6 ve GRP78 gen ekspresyon seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Western blot analizi sonuçlarına göre, IRE1 α ve ATF4 miktarlarında 20 μM H_2O_2 , 20 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231 ve 20 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231 konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.01$ ve $p<0.001$).

Sonuç olarak, bu çalışmada, BEAS-2B hücrelerinde, H_2O_2 aracılı oksidatif stresin ER stresini uyardığını ve UPR yolağını aktif hale getirdiği, ancak yeni sentezlenen benzimidazol türevi bileşik olan RHE-231'in ER stresini hafifletmede etkili olmadığı ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, BEAS-2B, ER stresi, Benzimidazol

ABSTRACT

Effect of Newly Synthesized Benzimidazole Derivative Compound on Endoplasmic Reticulum Stress and UPR Signaling Pathway in Hydrogen Peroxide-Induced BEAS-2B Cells

The airway epithelium forms the first defense barrier against inhaled harmful particles and infectious agents. Oxidative stress caused by reactive oxygen species in airway epithelial cells plays an important role in the pathophysiology of chronic airway diseases such as COPD.

In this thesis, the human bronchial epithelial cell line BEAS-2B cells, under the conditions of oxidative stress, it aimed to clarify at gene and protein levels endoplasmic reticulum (ER) stress occurs through which UPR pathway and whether the newly synthesized benzimidazole derivative compound (RHE-231) has a protective effect on ER stress and unfolded protein response (UPR) signaling pathway. In this respect, BEAS-2B cells were exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2) at different concentrations (0-200 μM) and durations (24 and 48 hours), and after appropriate concentrations (10 and 20 μM) and duration (24 hours) have been determined, oxidative damaged cell model created. Then, BEAS-2B cells were exposed to RHE-231 for 24 hours at different concentrations (0-100 μM) and appropriate concentrations (5 and 10 μM) were determined.

In this study, the oxidative damaged cell model was confirmed by spectrophotometric measurement of malondialdehyde (MDA) level. MDA levels were significantly higher in the BEAS-2B cells exposed to H_2O_2 at concentrations of 10 and 20 μM for 24 hours compared to the control group ($p=0.000$ at a concentration of 10 μM ; $p=0.000$ at a concentration of 20 μM). Among the UPR pathway parameters, IRE1 α (11.95 fold $p=0.026$ at 20 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231 concentration; 14.31 fold $p=0.000037$ at 20 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231 concentration), PERK (20 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231 3.65 times $p=0.032$; 20 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231 39.27 times $p=0.012$), but there was no significant difference between ATF6 and GRP78 gene expression levels ($p>0.05$). According to the results of the Western blot analysis, a significant increase was observed in the amounts of 20 μM H_2O_2 , 20 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231 and 20 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231 in the amounts of IRE1 α and ATF4 compared to the control group ($p<0.01$ and $p<0.001$).

In conclusion, in this study, it was demonstrated that H_2O_2 mediated oxidative stress in BEAS-2B cells stimulated ER stress and activated the UPR pathway, but the newly synthesized benzimidazole derivative compound RHE 231 was not effective in relieving ER stress.

Keywords: Oxidative stress, BEAS-2B, ER stress, Benzimidazole

1. GİRİŞ

Bugün tüm dünyada en sık rastlanılan ölüm nedenleri arasında altıncı sırada yer alan kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), zararlı partikül ve gazların kronik inhalasyonu sonucu akciğerlerde oluşan geri dönüşümsüz bir hastalıktır (Buist ve ark. 2007). Solunan sigara dumanı, hava kirliliği, mesleki maruziyet ve solunum enfeksiyonları gibi nedenler oksidatif strese neden olmakta, bunun neticesinde akciğerlerde solunum epitel hücrelerinin hasarına yol açmaktadır. Solunum epiteli hasar gördüğünde ise, pro-inflamatuvar sitokin kaynağı olmaktadır (Barnes 2008).

Solunum işlevinin büyük bir kısmını sağlamada solunum epitelinin önemi çok büyüktür. Solunum epiteli, dış çevre ile epitelin altında bulunan doku arasında fiziksel bir engel görevi görerek patojenlerin geçişini kısıtlar ve solunum yolunu yabancı partiküllerden korur (Wang ve ark. 2008, Adkinson ve ark. 2013). Bu nedenle, başta KOAH olmak üzere birçok akciğer hastalığı epitelyal anormalliklerle ilişkilendirilmiştir. KOAH gibi hastalıklardan muzdarip hastaların hava yolları “normal” hava yollarına kıyasla farklı fenotipler üreten hücresel yapısal değişiklikler (remodeling) geçirmektedir (Parker ve ark. 2010).

Reaktif oksijen türleri (ROS)’un aşırı üretimi, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine gelişerek hücre hasarına neden olan oksidatif strese yol açmaktadır (Finkel ve Holbrook 2000, Halliwell ve Whiteman 2004). Bu reaktif oksijen türleri, hücresel fonksiyonu direkt olarak etkileyebilmektedir. Yapılan çalışmalar, oksidatif stresin KOAH ve astım gibi çeşitli solunum yolu hastalıklarının patogeneğinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir (Arja ve ark. 2013, Morse ve Rosas 2014). Bu nedenle, oksidatif stres üzerine yapılan çalışmalar oksidatif stresin biyolojik etkilerini ortaya koymak adına önem arz etmektedir.

Endoplazmik retikulum (ER), protein katlanmasında görev alan, hemen hemen tüm membran ve sekretuvar proteinlerin post-translasyonel olarak işlendiği bir organeldir (Schröder ve Kaufman 2005a, Smith ve ark. 2011). Ancak, oksidatif stres, hipoksi, glukoz açlığı, kalsiyum seviyesindeki değişiklikler ve virüs enfeksiyonu gibi nedenlerden dolayı ER lümeninde yanlış katlanmış ve/veya katlanmamış proteinlerin birikmesi ER stresine neden olmaktadır (Malhotra ve Kaufman 2007a, Lin ve ark. 2008). ER stresi protein homeostazını

düzeltilmek için katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan hücre içi sinyal iletim yollarını tetikler (Davenport ve ark. 2008). UPR, ER membranında yer alan transmembran proteinlerini (PERK, IRE1 ve ATF6) artırır. Bu UPR proteinleri ER şaperonlarını artırarak, translasyonu inhibe ederek ve ER-ilişkili protein degradasyonu (ERAD) denilen işlem ile yanlış katlanmış proteinleri proteazomlar aracılığıyla degradasyon için sitozole taşıyarak ER stresinin hafifletilmesine yardım eder (Kincaid ve Kooper 2007). ER stresi hafifletilemediğinde ise, UPR hücre apoptozunu indükler (Walter ve Ron 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalar ER stresini hafifletmek için çeşitli terapötik ajanların kullanıldığını ortaya koymuştur (Gurer-Orhan ve ark. 2006, Zhang ve Wang 2018, Ge ve ark. 2018). Bu bileşiklerden en yaygın kullanılanlarının başında benzimidazol türevi bileşikler gelmektedir. Benzimidazol halkası aktif bir heterosiklik bileşik olduğundan çok sayıda farklı farmakolojik aktiviteye sahiptir (Hofmann 1953).

Bu tez çalışmasında, *in vitro* ortamda, insan akciğer bronş epitel hücreleri (BEAS-2B) hidrojen peroksit (H_2O_2)'ye maruz bırakılarak oksidatif hasarlı hücre modeli oluşturuldu. Böylelikle, H_2O_2 'nin meydana getirdiği oksidatif hasar yanıtının ER stres yolağına etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bir oksidan olan H_2O_2 'nin bronş epitel hücrelerinde oksidatif ve apoptotik hasara neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Xue ve ark. 2005, Kastner ve ark. 2011, Gao ve ark. 2012). Ancak, H_2O_2 ile indüklenen ROS'un BEAS-2B hücrelerinde ER stresinin ve UPR yolağının gen ve protein düzeyinde bir arada değerlendirildiği ve yeni sentezlenen benzimidazol türevi bir bileşik olan RHE-231'in ER stresi ve UPR sinyal yolağında koruyucu bir etkisinin olup olmadığı ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

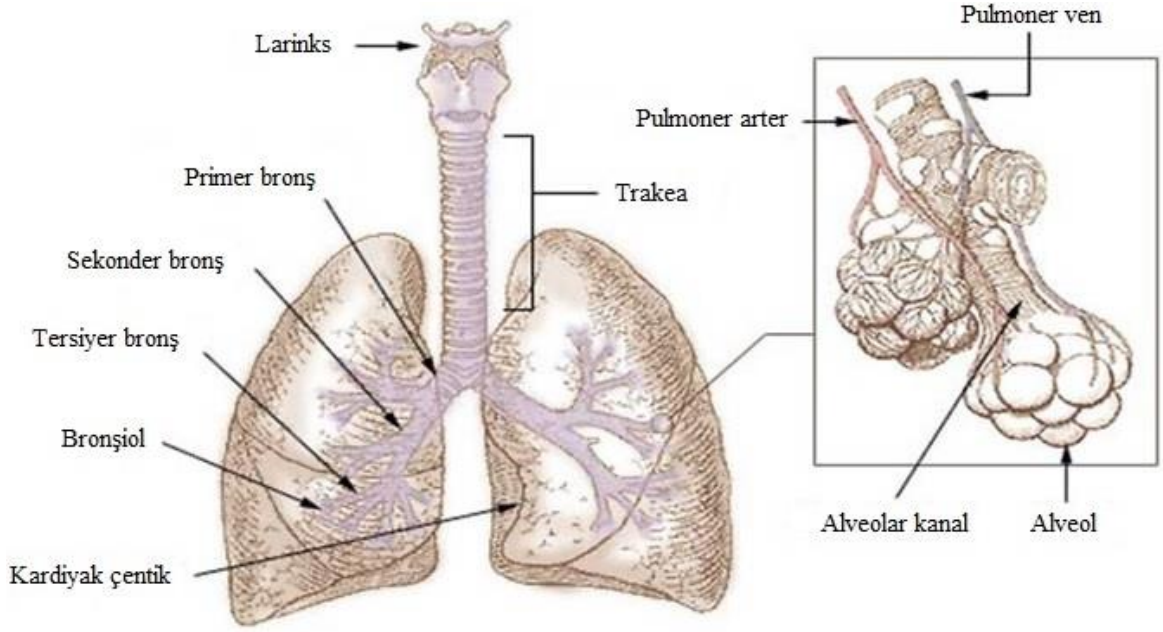
2.1. İnsan Solunum Epiteli

Epitel doku omurgalı vücut planındaki tüm tübüler organları örter ve vücut ile dış çevre arasında seçici bir filtre oluşturur (Johnson 2003, Marieb ve ark. 2013). Aynı zamanda iyon ve sıvı salgılar, seçici trans-epitelyal taşıma yapar ve fiziksel bir bariyer oluşturarak doku homeostazını korur (Jones 1990, Fleming 1992, Lodish ve ark. 2008). Epitelin organa özgü işlevleri çeşitlidir ve bu işlev hücre tipleri tarafından belirlenmektedir.

Solunum yolu, farklı epitel kombinasyonları ile kaplı 3 bölgeden (trakeobronşial bölge, bronşolar bölge ve bronşioalveolar bölge) oluşur. Solunum yolu larinksten başlayarak trakeadan aşağı doğru ilerler. Her bronшта bir tane olmak üzere iki bronшта dallanarak çok sayıda bronşiole ayrılır ve akciğer duvarlarında milyonlarca alveolar keseye sonlanır (Şekil 2.1) (Hillery ve ark. 2003). Solunum yolunun tamamı, iletken ve proksimal bölgelerdeki besin-atık değişiminin ve alveolar bölgedeki gaz değişiminin sağlanması için yoğun bir damar ağı tarafından desteklenir (Dunsmore ve Rannels 1996).

Solunum epiteli, solunum yolunun ayrılmaz bir parçasıdır ve solunum yüzeyini invaziv patojenlerden veya yabancı partiküllerden korumak için çeşitli savunma mekanizmalarına sahiptir (Wang ve ark. 2008). Bu nedenle, solunum epitel hücre hatları solunum yolu hastalıklarını *in vitro* olarak incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Feltens ve ark. 2010, Kode ve ark. 2006).

İnsan solunum epiteli, kıkırdaklı trakeadan gaz değiştirici alveollere kadar tüm solunum yolu astarını oluşturur. Hava yolları, trakeadan bronşlara, solunum bronşioollerine ve son olarak da alveolar kanallara kadar kademeli olarak azalır (Empey 1978). Bu farklı bölgelerdeki solunum yolunun hücresel yapısı o bölümün işlevine göre değişir. Son yıllarda, solunum epitel hücrelerinin bir organa özgü immün mikro çevrenin şekillenmesinde rol oynadığı bulunmuştur (Holtzman ve ark. 2014, Weitnauer ve ark. 2016).



Şekil 2.1. İnsan solunum yolunun yapısı
(<https://training.seer.cancer.gov/anatomy/respiratory/passages/bronchi.html>)

2.1.1. Solunum Epitelinin Yapısı

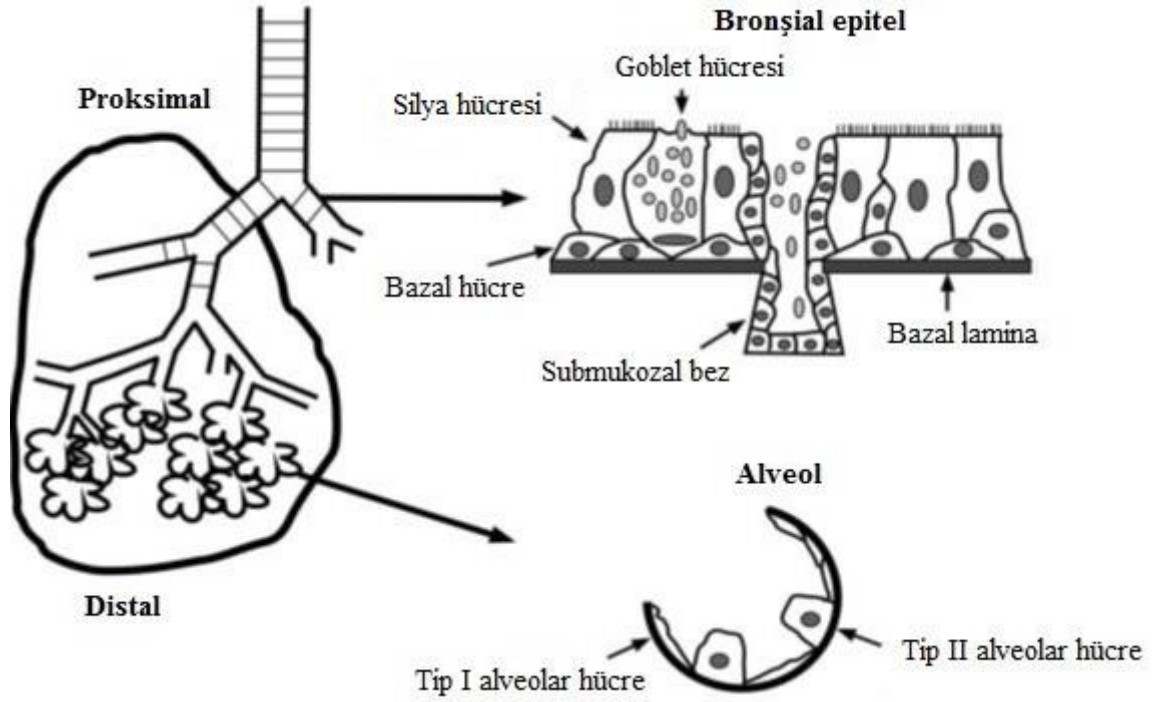
Epitel dokular rejeneratif kapasitede olup, konfluent ve inerve olmaları bakımından diğer doku tiplerinden ayırt edici özelliklere sahiptirler (Marieb ve ark. 2013, Warburton ve ark. 2008). Epitel dokular hücre-hücre (Baum ve Georgiou 2011, Sawada ve ark. 2003) ve hücre-substratum temasında oldukça uzmanlaşmışlardır (Nievers ve ark. 1999). Epitel hücrelerinin üzerinde bulunduğu substratum, epitel rejenerasyonu için önemli olan iskeleyi oluşturmaktadır (Baranowsky ve ark. 2010).

Epitel dokuların en önemli özelliği, polariteye sahip olmalarıdır (St Johnston ve Ahringer 2010). Solunum epitelinde lümen bakan hücre membranı bileşim, yapı ve fonksiyon bakımından bazal ve lateral yüzeyden farklıdır. Bu yüzden apikal bazal polarite epitel fonksiyonu için kritik öneme sahiptir (St Johnston ve Sanson 2011). Apikal yüzey, dış çevre (akciğerler) ile etkileşime olanak sağlamak için hücre-hücre teması içermez iken, lateral yüzey komşu hücrelerle sıkı bağlantılar, adherens kavşaklar ve epitel dokuların seçici-geçirgen bariyerini oluşturmak için sinerjik olarak işlev yapan geçit bağlantı proteinleri ile sıkı temas halindedir (Lal-Nag ve Morin 2009, Shin ve ark. 2006). Bazal bölme, altta

bulunan vaskülatürün yakınında besin ve atık ürün değişiminin meydana geldiği çeşitli integrinler ile bazal membrana bağlıdır (Albelda ve Buck 1990).

Solunum epiteli, solunum yolunun korunmasında işlev gören özel bir psödostratifiye (yalancı çok katlı) prizmatik epitel hücre tipinden meydana gelmektedir. Psödostratifiye prizmatik epitel yapısında, tüm hücreler doğrudan bazal membrana bağlanır ancak tüm hücreler lümen bölmesine ulaşmazlar. Bronşolar bölge, yüzey gerilimini azaltmak için yüzey aktif madde (sürfaktan) salgılayan basit kübik hücre popülasyonundan meydana gelmektedir. Alveolar bölge ise, yüzey alanı ile gaz değişimini kolaylaştıran basit skuamöz (yassı) epitel hücre tipinden meydana gelmektedir (Johnson 2003). Basit skuamöz epitel geniş yüzey alanına sahiptir ve bu sayede basit difüzyonun hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu durum, akciğerlerin solunum bölgesini oluşturan alveollerdeki gaz alışverişini kolaylaştırmaktadır (Johnson 2003, Marieb ve ark. 2013). Alveolar bölgede iki farklı hücre tipi mevcuttur. Bunlardan birincisi, solunum yüzeyinin % 90'ını kaplayan ve ana işlevi gaz değişimi olan Tip I alveolar hücrelerdir. İkincisi ise, birçok sürfaktan proteini ve ekstraselüler matriks bileşenlerini salgılayarak alveolar boşluğu korumakla görevli Tip II alveolar hücrelerdir (Serrano-Mollar 2012).

Solunum epiteli, bazal hücreler, salgı hücreleri ve silya hücreleri olmak üzere 3 farklı hücre tipinden meydana gelmektedir (Şekil 2.2) (Spina 1998).



Şekil 2.2. Solunum epitelinde yer alan hücre tipleri (Zaheer 2010)

2.1.1.1. Bazal Hücreler

Bazal hücreler, karakteristik olarak solunum epitelinin en küçük hücreleridir. Bu hücreler, sitoplazmik orana kıyasla büyük ve yoğun şekilde boyanan bir çekirdeğe sahiptir (Hicks ve ark. 1997). Bazal hücrelerin temel rolü, solunum epitel hücrelerini bir arada tutmak için bazal lamina ve prizmatik epitel ile etkileşime girmektir (Green ve Jones 1996). Bazal hücreler, bazal laminaya sıkı bir şekilde bağlanan tek hücre tipi olduğu için bu bağlar kuvvetlidir. Trakeal prizmatik hücreler desmozomal bağlantılar kullanarak bazal hücrelere ve komşu hücrelere bağlanır (Green ve Jones 1996). Desmozomal bağlantıların sayısı, epitel üzerindeki fiziksel stres seviyesinin yanı sıra yapışkanlığı ile de ilişkili olabilmektedir (Evans ve ark. 1990). Bazal hücreler epitelin yüksekliğine ve desmozomal eklerin sayısına göre farklılaştıklarından solunum epitelinin bütünlüğü açısından önemlidir. Bazal hücrelerin 15-lipoksijenaz ve nötral endopeptidaz gibi çeşitli sitokinleri salgılamasının yanı sıra, goblet ve silya hücrelerinin orijin aldığı birincil hücre tipi olduğu da düşünülmektedir (Boers ve ark. 1998, Knight ve Holgate 2003).

2.1.1.2. Salgı Hücreleri

Salgı hücreleri, goblet hücreleri ve seröz hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücre tiplerinden goblet hücrelerinin ana özelliği, membrana bağlı, elektron geçirgen, asidik ve solunum yolu boyunca salgılanan müsin granüllerinin olmasıdır (Evans ve ark. 2004, Zhu ve ark. 2008). Müsin mukusun ana bileşenidir. Bu mukus, istilacı patojenlerin ve yabancı partiküllerin solunum epiteline zarar vermeden uzaklaştırılması ve solunum epitelinin kurumasını önlemek için gereklidir. Mukus, glikoprotein yapıdaki müsin ve lizozim, defensin, immünoglobulin A (IgA) ve çeşitli sitokinler gibi antiviral ve antiinflamatuvar bileşenlerden oluşan viskoelastik bir jeldir (Nicholas ve ark. 2006). Mukusun viskoelastik özellikleri mukosiliyer klirens için gerekli olan müsin proteinlerine bağlıdır (Even-Tzur ve ark. 2008). Mukusun kontrollü üretimi, solunum yolu sağlığı için önemlidir (Farmer ve Hay 1991). Kimyasal iritanlar, bağışıklık salgıları ve hava akımı mukus salgılanmasını artırabilmektedir (Even-Tzur ve ark. 2008). Goblet hücreleri, salgılanan mukus miktarı, mukusun asitliği ve viskozitesinin yanı sıra, fonksiyonel mukus oluşturmadaki tüm önemli medyatörlerin düzenlenmesinde rol oynar. Normal insan hava yollarında diğer epitel hücrelerin çoğalmasına bağlı olarak, şekil ve boyut olarak değişen epitelyal yüzey (mm²) başına yaklaşık 6800 goblet hücresi (Knight ve Holgate 2003) yer almaktadır (Rogers 2003).

Salgı hücrelerinin ikincisi, seröz hücrelerdir. Bu hücreler goblet hücreleri ile benzer morfolojiye sahiptir. Fakat granülleri sadece birkaç elektronun geçişine izin verecek şekilde farklılaşmıştır (Rogers 2003). Seröz hücreler, akciğerlerdeki kas hareketinin yarattığı sürtünmeyi azaltmak için lubrikant görevi görmektedir.

2.1.1.3. Silya Hücreleri

Solunum epiteli boyunca en baskın hücre tipi olan silya hücreleri, bazal hücrelerden ortaya çıkan epitel hücrelerdir. Her bir hücre, mukosiliyer klirens işleminin bir parçası olarak mukusun periferik hava yollarından trakeaya doğru iletilmesini sağlamaktadır (Knight ve Holgate 2003).

2.1.2. Solunum Epitelinin Fonksiyonu

Solunum epitelinin en önemli fonksiyonu, iyon transportu ve yabancı istilacı partiküllere karşı bariyer görevidir (Koval 2009, Tsukita ve Furuse 2000). Epitelyal bariyer fonksiyonu, çeşitli hücre tiplerini bir arada tutan sıkı kavşaklar, adherens kavşaklar ve desmozomlar gibi epitel hücre tabakasında yer alan ve epitel bütünlüğünün korunmasında görevli bağlantı mekanizmaları ile gerçekleştirilir (Roche ve ark. 1993, Thompson ve ark. 1995). Bu hücre-hücre kavşakları, dokudaki mekanik gücü korur ve komşu hücreler arasındaki iletişimi mümkün kılar. Bunun yanında, epitelyal hücre reseptörlerine erişebilecekleri ve/veya antijen üreten hücreleri aktive edebilecekleri bazolateral membran içine virüs, bakteri veya inhale alerjenlerin girişini engelleyen güçlü adezyon sağlar (Roche ve ark. 1993).

Solunum epitelinde bulunan goblet hücreleri ve submukozal bezler tarafından salgılanan mukus, yabancı partikülleri (bakteriler ve virüsler dahil) yakalayarak alt hava yollarını korur. Bu partikülleri tutan mukus silya hücreleri ile trakeaya doğru taşınarak atılır. Epitel ayrıca, çeşitli antimikrobiyalleri (laktoferrin, defensin ve katelekidin dahil), anti-proteazları (sekretuvar lökoproteaz inhibitörü, elafin ve alfa-1 antitripsin (AAT) dahil) ve yabancı maddelerin yakalanmasına ve temizlenmesine yardımcı olan ek koruyucu mekanizma olarak antioksidanları salgılar (Thompson ve ark. 1995).

Solunum epitelinde bulunan yapısal hücreler, bronş duvarının bütünlüğünü korur ve inhale edilen zararlı maddelere karşı ilk savunma hattını oluşturur (Reynold ve Panettieri 2004, Tamimi ve ark. 2012). Bu yapısal hücreler uzun süre hayatta kaldıklarından dolayı akciğer çoğunlukla proliferatif değildir (Cardoso ve Whitsett 2008, Ghosh ve ark. 2013). Fakat solunan sigara dumanı, hava kirliliği, mesleki maruziyet ve solunum enfeksiyonları gibi nedenler oksidatif strese ve epitel hasarına neden olur (Barnes 2008). Bu durumda hasar gören bölgenin hızlı bir şekilde kapatılması ve fiziksel bariyerin korunması için farklılaşmış epitel hücreleri ile yer değiştirilmesi önemlidir (Cardoso ve Whitsett 2008, Ghosh ve ark. 2013). Hava yollarındaki yapısal hücreler tarafından başlatılan inflamatuvar yanıt immün hücreler tarafından güçlendirilerek solunum yolunun yeniden modellenmesine (remodeling) neden olmaktadır (Reynold ve Panettieri 2004, Tamimi ve ark. 2012).

2.1.3. Solunum Epiteli Hastalıkları

Solunum işlevinin büyük bir kısmını sağlamada solunum epitelinin önemi çok büyüktür. Bu yüzden, birçok akciğer hastalığı epitelyal anormalliklerle ilişkilidir. Astım, kistik fibrozis (KF) ve Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi hastalıklardan muzdarip hastaların hava yolları “normal” hava yollarına kıyasla farklı fenotipler üreten hücresel yapısal değişiklikler (remodeling) geçirmektedir. Bu tip solunum yolu hastalıklarında solunum yollarındaki goblet hücre sayısı artarken, silya hücreleri azalmaktadır. Aynı zamanda yapısal hasara karşı duyarlılıkları artmaktadır (Parker ve ark. 2010).

Solunum epitelinde bulunan silya hücrelerini örten mukus tabakası, inhale edilen partikülleri hava yollarından yakalar ve çıkartır. Bu süreç mukosilyer klirens olarak adlandırılır (Rogers 2005). KOAH'ta, solunan sigara dumanı ve hava kirliliği gibi nedenlerden dolayı mukosilyer fonksiyon bozulur. Bu durum, aşırı mukus üretimine, solunum yolunun tıkanmasına ve enfeksiyonuna neden olur (Koblizek ve ark. 2011, Liu ve Di 2012).

Solunum epitel hücreleri doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtın ayrılmaz bir parçasıdır. Müsin, defensin ve sekretuar lökoproteaz inhibitörü gibi antimikrobiyal peptitler üreten (Barnes 2004), fagositleri enfeksiyon bölgesine yerleştiren ve pro-inflamatuvar sitokinler üreten (Li ve ark. 2012) solunum epitel hücreleri, sigara dumanı ve diğer zararlı parçacıklardan dolayı bu yararlı rollerini değiştirebilmekte ve KOAH hastalarını solunum enfeksiyonu ve alevlenmeye karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Dacydchenko ve Bova 2007, Hurst ve ark. 2010).

2.1.3.1. Astım

Astım, değişken hava akımı obstrüksiyonu, solunum yolu inflamasyonu ve solunum yolu aşırı duyarlılığı ile karakterize edilen inflamatuvar bir hastalıktır (Sont ve ark. 1999). Semptomları bronko-konstrüksiyon, hipersensitif hava yolları, nefes darlığı ve hırıltı şeklinde gerçekleşmektedir. Astım hastalarında solunum epitelinin mikro çevresinin korunmasından sorumlu olan epitelyal-mezenkimal trofik birimin düzensiz hale geldiği ve

böylece epitelin hasara duyarlı hale geldiği düşünülmektedir (Holgate ve ark. 2009). Reader ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, mukoz hücrelerde metaplazi modeli oluşturmuşlar ve epitelyal hasar sonrası bronşiollerde bulunan salgı hücresi olan Clara hücrelerinde % 75'lik bir azalma ve total hücre popülasyonunun yaklaşık % 70'ini oluşturan silya hücrelerinde ise % 25'lik bir azalma olduğunu görmüşlerdir. Buna rağmen, hücrelerin sayısında hiçbir değişiklik olmadığını göstermişlerdir. Bu durum, normal hava yollarında toplam hücrelerin yaklaşık % 50'sini oluşturan silya hücreleri iken, goblet hücrelerinin baskın hücre tipine dönüştüğünü göstermektedir (Spina 1998). Goblet hücre sayısındaki artış, mukusun fazla salgılanmasına yol açarak, silya hücreleri tarafından patojenlerin etkili bir şekilde temizlenememesine ve hava akımının tıkanmasına yol açmaktadır.

2.1.3.2. Kistik Fibrozis (KF)

Kistik fibrozis (KF), kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) genindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişen otozomal resesif bir genetik bozukluktur. Bu gendeki mutasyon, klorür iyon kanalının işlevinin bozulmasına ve epitel boyunca klorür ve sodyumun anormal taşınmasına neden olmaktadır (Trapnell ve ark. 1991). Bu durum yüzey mukus tabakası ve silyaların sıkışmasına neden olarak mukosiliyer klirensin durmasına neden olmaktadır (Button ve ark. 2012).

2.1.3.3. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH)

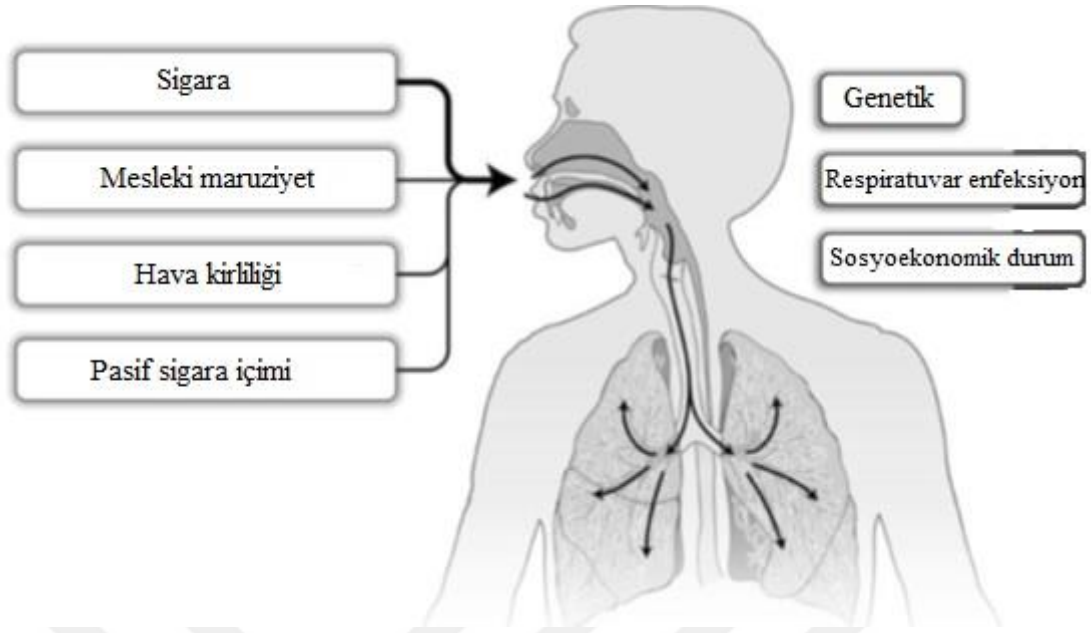
Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), zararlı partikül ve gazların kronik inhalasyonu sonucu akciğerlerde oluşan anormal inflamatuvar yanıtın neden olduğu bir hastalıktır. Akciğerlerde oluşan bu kronik inflamasyon hava akımındaki kısıtlılığa katkıda bulunmaktadır. Bugün tüm dünyada en sık rastlanılan ölüm nedenleri arasında 6. sırada yer alan KOAH'ın 2030 yılına kadar 4. sırada yer alması beklenmektedir (Mathers ve Loncar 2006). KOAH'ta bir taraftan yapısal proteinlerin birikmesi, küçük solunum yolu duvarının kalınlaşması ve mukus üretimi meydana gelirken, diğer taraftan alveolde yapısal proteinlerin degradasyonu, alveol dokusunun kaybı, elastik retansiyon kaybı ve kronik bronşit meydana

gelmektedir. Bu özellikler ayrı ayrı ve/veya aynı hastada olabilmektedir (Barnes ve ark. 2003, Barnes 2008). KOAH'ın, özellikle yaşlılarda, morbidite ve mortalite oranı artmaktadır (Mannino ve Kiri 2006).

Aktive olmuş inflamatuvar hücrelerden akciğer yapılarında hasara yol açabilen ve/veya nötrofilik inflamasyonun sürmesine neden olan lökotrien B₄ (LTB₄), interlökin 8 (IL-8), tümör nekroz faktör α (TNF α) ve benzeri bir dizi medyatör salınmaktadır. İnflamasyona ek olarak, akciğerlerdeki proteaz dengesi bozukluğu ve oksidatif stresin de patogeneze önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Hill ve ark. 1999, Mak 2008, Spurzem ve Rennard 2005).

2.1.3.3.1. KOAH'ta Risk Faktörleri

Endüstrileşmiş ülkelerde KOAH için en önemli risk faktörü sigara kullanımı olsa da, KOAH'ın sigara kullanmayan kişiler arasında da yaygın olarak görüldüğü bilinmektedir (Mannino ve Buist 2007). Sigara kullanımı dışında KOAH gelişiminde rol oynayan en belirgin risk faktörleri, kalıtsal alfa-1 antitripsin (AAT) eksikliği, mesleki maruziyet, pasif sigara içme, hava kirliliği, düşük doğum ağırlığı, solunum yolu enfeksiyonları (bakteriyel ve viral), cinsiyet, ırk, yaş ve sosyoekonomik durumdur (Şekil 2.3) (Salvi ve Barnes 2009, Berndt ve ark. 2012). Yapılan çalışmalarda, KOAH'lı hastaların % 95'i sigara içmesine rağmen, sigara içenlerin sadece % 10-15'inde KOAH geliştiği görülmüştür. Bu da diğer risk faktörlerinin KOAH gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Barnes 2004, Lopez ve ark. 2006, Mannino ve Buist 2007, Mannino ve Kiri 2006, Pillai ve ark. 2009, Postma ve ark. 2011, Soriano ve Rodriguez-Roisin 2011). KOAH patogenezinde rol oynayan mekanizmalar, kalıcı inflamasyon, oksidatif stres, hücre ölümü ve ekstraselüler matriksin yıkımıdır (Yoshida ve Tudor 2007). Bununla birlikte, KOAH gelişmesine aracılık eden spesifik genler ve altta yatan patogeneze mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.



Şekil 2.3. KOAH ile ilişkili risk faktörleri (Salvi ve Barnes 2009, Berndt ve ark. 2012)

2.1.3.3.1.1. Sigara

Tüm dünyada morbidite ve mortalitenin önde gelen sebeplerinden biri olan KOAH'ın gelişmesinde sigara içme birincil risk faktörüdür (Decramer ve ark. 2012). Sigara dumanı zararlı parçacıklar, kimyasallar ve ROS dahil 5000'den fazla kimyasalın kompleks bir karışımıdır (Pryor ve Stone 1993, Rahman ve Adcock 2006, Min ve ark. 2011). Bu karışım hem inflamatuvar medyatörlerin hem de oksidanların üretilmesine neden olur (Kirkham ve ark. 2003, Kirkham ve ark. 2004).

Fiziksel bariyerler ve bağışıklık sistemi insan akciğerlerini çevre kirliliği, bakteri, virüs ve mantar gibi zararlı çevresel etkenlerden korumaktadır (Nikola ve Stampfli 2012). Fakat sürekli sigara içme, epitelyal geçirgenliği artırarak mukosilyer klirensi azaltmakta ve bu bariyerleri etkilemektedir (Van der Vaart ve ark. 2004, Forteza ve ark. 2012). Buna ek olarak, hem KOAH'lı olanlar, hem de sigara içenler, özellikle de KOAH'ın ilerleyen aşamalarında (GOLD III-IV) alevlenmelerin ana sebebi olan solunum yolu enfeksiyonuna duyarlıdırlar (Arcavi ve Benowitz 2004, Churg ve ark. 2008).

Pasif sigara içmenin ise, sigara dumanındaki karsinojenik, teratojenik, irritan ve toksik maddelere maruziyete neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar, pasif sigara içmenin KOAH,

akciğer kanseri ve kardivasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın ortaya çıkmasına yol açtığını ve bazı hastalıkların da seyrini ağırlaştırdığını göstermiştir (Mannino ve ark. 2008).

2.1.3.3.1.2. Mesleki Maruziyet

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı'nda mesleki maruziyete bağlı riskin sigara içenlerde yaklaşık % 19, sigara içmeyenlerde ise, % 31 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Sigara içmeyen bireyler arasında kırsal alanlarda yaşayanların önemli derecede organik partiküllere (örneğin; bitki tozları, bakteriyel ya da fungal toksinler) maruz kaldığı, tekstil endüstrisinde çalışanların yüksek oranda bitki tozlarına (örneğin; pamuk tozu) maruz kaldığı ve sanayi ortamında (örneğin; madencilik, demir-çelik endüstrisi, ahşap sanayi ve inşaat sektörü) çalışanların diğer yabancı partiküllere maruz kaldığı görülmüştür (Hnizto ve ark. 2002). Yapılan bir çalışmada, hem sigara içme hem de mesleki faktörlere ortak maruziyetin KOAH riskini belirgin olarak artırdığı bulunmuştur (Blanc ve ark. 2009).

2.1.3.3.1.3. Alfa-1 Antitripsin (AAT) Eksikliği

Bir akut faz reaktanı olan AAT'nin antiproteaz aktivitesi fizyolojik açıdan önemlidir. Genetik mutasyonlarla ortaya çıkan sistemik AAT eksikliği, akciğerlerde amfizem ve kronik bronşit gelişimine neden olmaktadır (Tuder ve ark. 2010).

2.1.3.3.1.4. Hava Kirliliği

Çevresel hava kirliliğinin KOAH gibi solunum yolu hastalıklarının gelişiminde tetikleyici faktör olduğu bilinmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde ev ortamında yemek pişirirken dumana maruz kalmak veya kötü havalandırılmalı bir evde ısıtma sisteminden dolayı kirliliğe maruz kalmak KOAH için önemli bir risk faktörüdür. Hava kirliliğinden kaynaklanan organik bileşiklerin solunum epitel hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu indüklediği bilinmektedir (Bonvallot ve ark. 2001, Li ve ark.

2003). Hava kirliliğinin en yoğun olduğu zamanlarda, en ağır KOAH hastalarında hava kirliliğinin hastalığın seyrinde ağırlaştırıcı bir faktör olduğu gösterilmiştir (Wordley ve ark. 1997, Ko ve ark. 2007).

2.1.3.3.1.5. Yaş ve Cinsiyet

KOAH prevalansı yaşla birlikte artmaktadır (Niewoehner ve ark. 2007). Otuz-kırk yaşlarından itibaren solunum fonksiyonlarında fizyolojik bir düşüş olmaktadır.

Epidemiyolojik açıdan, erkeklerin sigara alışkanlıkları nedeniyle, kadınlara göre daha fazla KOAH gelişme riski vardır. Ancak, kadınlar arasında sigara içme oranının artmasıyla KOAH gelişimi açısından erkeklerle eşdeğer bir risk taşımaktadır (Mannino ve Buist 2007, Prescott ve ark. 1997).

2.1.3.3.1.6. Sosyoekonomik Durum

Sosyal ve ekonomik bakımdan koşulların düşük olması, akciğer fonksiyonlarını olumsuz etkilemekte ve KOAH gelişme riskini artırmaktadır (Shohaimi ve ark. 2004).

2.1.4. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücre içindeki oksidan-antioksidan dengesinin hücre hasarına neden olan oksidanlar lehine gelişmesiyle ortaya çıkar. Oksidatif stres hücrelerde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumundaki artış kaynaklı veya antioksidan korumadaki azalma kaynaklı meydana gelmektedir (Halliwell ve Whiteman 2004). Bu durum, yeni başlayan kronik hastalıklarda, sitokin düzeylerindeki artış veya azalış ile sonuçlanır (Feltens ve ark. 2010).

Reaktif oksijen türleri, oksijen atomu içeren, kimyasal olarak yüksek reaktif moleküller olan serbest radikallerdir (Waris ve ark. 2006, Genestra ve ark. 2007, Rigas ve ark. 2008). Reaktif oksijen türleri hücre içinde ikincil haberci olarak hareket ederler. Bu nedenle, hücre içindeki birçok enzimatik reaksiyon sırasında (örneğin; mitokondriyal

solunum zinciri reaksiyonları, araşidonik asit yolağı, sitokrom P450 ailesi ve glukoz oksidaz, amino asit oksidaz, ksantin oksidaz, NADP/NADPH oksidaz veya NO sentaz) (Malhotra ve Kaufman 2007a, Perjes ve ark. 2012) doğal yan ürünler olarak düşük konsantrasyonlarda üretilirler (Valko ve ark. 2006). Nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ve aktivator protein 1 (AP-1) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri ROS tarafından düzenlenmektedir (Kirkham ve Rahman 2006). Normal koşullarda ROS, hücrel redoks homeostazını korumak için enzimatik (örneğin; katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz) ve enzimatik olmayan antioksidan moleküller (örneğin; glutatyon, bakır ve demir şelatlayıcıları, flavonoidler, A vitamini) tarafından detoksifiye edilir (Mohora ve ark. 2009). Fakat radyasyon ve/veya çevresel kirlleticiler gibi toksik maddelere maruz kalınması (Malhotra ve Kaufman 2007a, Perjes ve ark. 2012), antioksidan sistemi bozarak hücre içinde fazla miktarda ROS birikmesine neden olur (Stone ve Donaldson 2006). Reaktif oksijen türlerinin birikmesi, membran fosfolipidlerini oksitleyerek membran yapısının bozulmasına yol açan lipid peroksidasyonuna neden olur (Zhornik ve ark. 2012). Bunun yanında, DNA'yı etkileyerek mutasyona neden olur ve hücre ölümüne kadar varan süreci tetikler. Metiyonin, tirozin ve sistein gibi amino asitlerle reaksiyona girerek fonksiyonlarının değişmesine neden olur (Stone ve Donaldson 2006, Zhornik ve ark. 2012).

Reaktif oksijen türleri, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$) ve perhidroksil radikali ($HO_2^{\bullet}$) gibi serbest radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit ($HOCl$) gibi radikalleri içermektedir (Pryor ve Stone 1993, Negre-Salvayre ve ark. 2008, Waris ve ark. 2006, Genestra ve ark. 2007, Rigas ve ark. 2008).

Hidrojen peroksit, canlı hücrelerin fizyolojik bir bileşenidir ve çeşitli hücrel yollar ile sürekli üretilmektedir (Gulden ve ark. 2010). H_2O_2 küçük, yüksüz bir molekül olduğundan hücre membranını kolayca geçebilir ve çoklu subelüler kompartmanlarda lokalize olur (Bienert ve ark. 2006). Hücrelerde, H_2O_2 , mitokondride (örneğin; glutatyon peroksidaz) veya peroksizomlarda (örneğin; katalaz) yer alan çeşitli koruyucu mekanizmalarla degrade edilir (Farber 1994, Masaki ve ark. 1998, Mohora ve ark. 2009). H_2O_2 üretimi ve degradasyonu arasındaki dengesizlik oksidatif hasara yol açar (Buettner 2011).

Çok sayıda çalışma, H_2O_2 'nin hücre kültür ortamına tek ya da tekrarlanan bolus halinde eklendiğinde verdiği yanıtı araştırmıştır (Sim ve ark. 2017, Sobotta ve ark. 2013). Hücrelerin, H_2O_2 'ye akut (tek) veya kronik (tekrarlanan bolus) maruz bırakılmasına verdiği

yanıt farklılık göstermektedir. Hidrojen peroksitin konsantrasyonuna bağlı olarak, akut maruz bırakılma, verilen hasarı önleyen bir dizi hücre içi antioksidan mekanizmayı tetiklerken, kronik maruz bırakılma, apoptoz veya nekroz ile hücre ölümünü indükler (Eno ve ark. 2013, Al-Qenaei ve ark. 2014).

2.1.4.1. Oksidatif Stres-KOAH İlişkisi

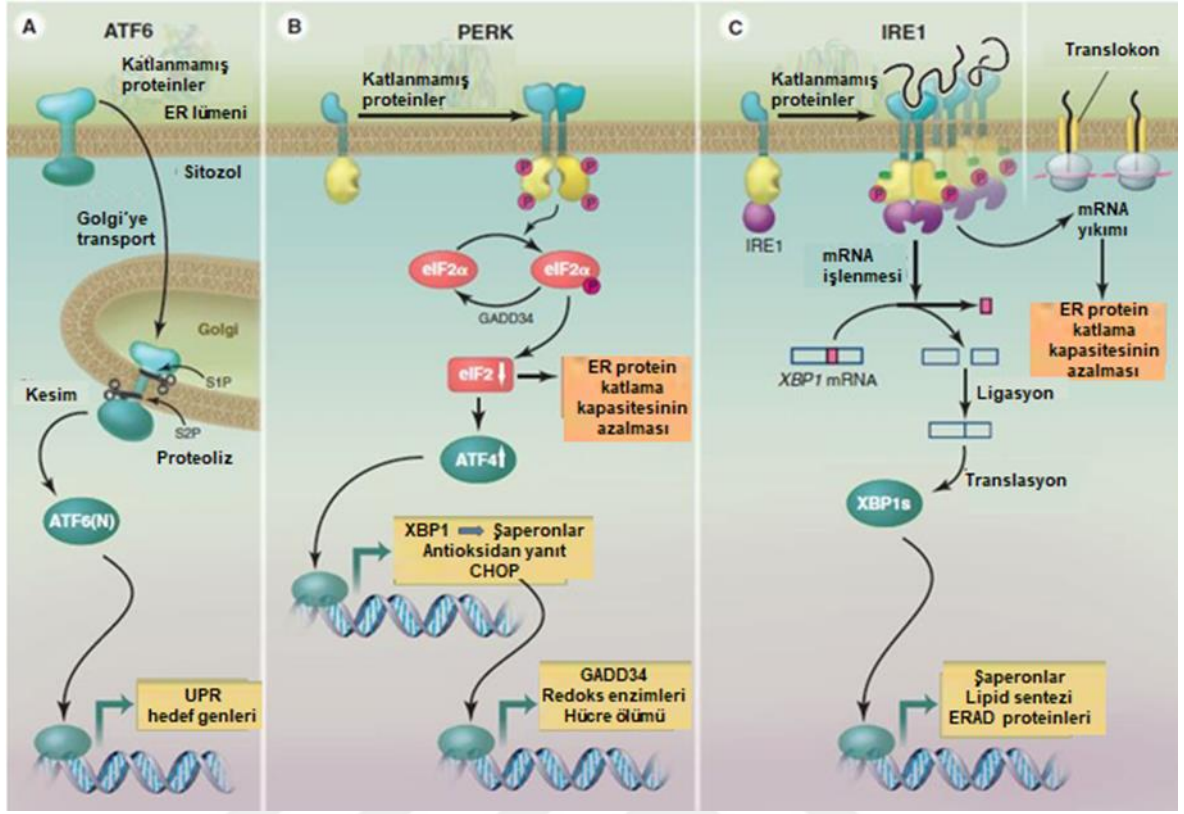
Sigara dumanı, hava kirliliği, inhale partiküller, fagositler ve inflamasyon gibi çeşitli patolojik ve fizyolojik koşullar hücre içi ROS miktarının artmasına neden olur (Meyer ve ark. 1994, Kim ve ark. 2013). Bu durum antioksidan-oksidan dengesinin bozulmasına ve başta KOAH olmak üzere astım, kronik fibrozis gibi kronik akciğer hastalıklarının patogenezinin sorumlu mekanizmalardan en önemlisi olan oksidatif strese neden olmaktadır (Greene 1995, Rahman 2002, Pastor ve ark. 2013). Nitekim, sigara içenlerde ve KOAH'lı hastalarda MDA düzeyinin yüksek olması, plazma C vitamini düzeyinin ve glutatyon düzeyinin ise düşük olması, sigara dumanından kaynaklı oksidatif stresin indüklendiğini göstermektedir (Arpaci ve ark. 2018, Calikoglu ve ark. 2002, Tkacova ve ark. 2007, Tsuchiya ve ark. 2002). Bu oksidatif stres, akciğer hücrelerini hasara uğratarak mukus hipersekresyonuna, antiproteazların ve sürfaktanların oksidatif inaktivasyonuna, membran lipid peroksidasyonuna, ekstraselüler matriksin yeniden yapılanmasına (remodeling) neden olur. Bunun yanında, redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri üzerinden akciğer inflamasyonunu artırarak KOAH'ın gelişmesine ve alevlenmesine katkıda bulunan apoptoza neden olmaktadır (Meyer ve ark. 1994, Rahman 2005).

2.1.5. ER Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), protein katlanmasında rol alan, hemen hemen tüm membran ve sekretuar proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarından sorumlu, çeşitli şaperonlar, foldazlar, disülfid izomerazlar ve oksidoredüktazları içeren bir organeldir (Schröder ve Kaufman 2005a, Smith ve ark. 2011). Sadece uygun şekilde katlanmış proteinler golgi aygıtına gönderilmekte ve orada modifiye edilerek hedef alanlarına

translokasyon yapılmaktadır (Smith ve ark. 2011). Fakat besin yokluğu, hipoksi, oksidatif stres, anormal glikozilasyon durumu, kalsiyum homeostazının bozulması ve virüs enfeksiyonu gibi nedenlerden dolayı protein katlama kapasitesi ER protein yükünü aşar. Bu durumda ER lümeninde yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler birikerek ER stresine neden olur (Roberson ve ark. 2012, Loose ve ark. 2014). Protein katlama yükünün etkili bir şekilde hafifletilmesi, ER homeostazının korunması için esastır (Karagöz ve ark. 2017). Zira, aşırı ER stresi protein sentezi ve sekresyonunu engeller, ROS oluşumunu indükler, NF- κ B aktivasyonu aracılığıyla inflamasyonu artırır ve transkripsiyon faktörü CCAAT güçlendirici bağlayıcı protein C/EBP homolog protein (CHOP)'un ekspresyonu aracılığıyla apoptotik hücre ölümüne neden olur (Kincaid ve Kooper 2007). ER homeostazını dengelemek için hücre, katlanmamış protein cevabı (UPR)'yi aktive eder. UPR, hem sağ kalıma yönelik, hem de apoptoza yönelik etkiye sahip hücre iletim yolağıdır (Szegezdi ve ark. 2006). Aynı molekül sağ kalıma yönelik ER homeostazını yeniden kurmak için protein katlanmasını artırıcı yönde etkili olabildiği gibi, stres ortadan kaldırılamadığında hücre ölümüne yönelik yolları etkinleştirerek hücreyi apoptoza yönlendirmektedir (Schröder ve Kaufman 2005b, Fribley ve ark. 2009, Hummasti ve Hotamisligil 2010).

Katlanmamış protein cevabı üç ER transmembran reseptörü ile gerçekleştirilir: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6), inositol gerektiren enzim 1 (IRE1) ve protein kinaz benzeri ER kinaz (PERK) (Şekil 2.4) (Ron ve Walter 2007).



Şekil 2.4. Katlanmamış protein cevabının üç yolağı (Walter ve Ron 2011)

Normal şartlar altında, ER içinde proteinlerin hatasız katlanması, katlanmış haldeki proteinlerin konformasyonlarının korunması ve katlanma sırasında oluşan ara yapıların kümelenmesine engel olan moleküler şaperonlar bulunmaktadır (Wu ve Kaufman 2006). Isı şok proteini 70 (Hsp70) şaperon ailesinin bir üyesi olan immünoglobulin bağlayıcı protein (BiP) (aynı zamanda glukoz düzenleyici protein 78 (GRP78) olarak da bilinir), UPR yolağında ana düzenleyici olarak kullanılmaktadır (Zhang ve Kaufman 2004). Protein katlanmasında olduğu kadar protein kalite kontrolünde de düzenleyici olarak rol oynayan BiP, amino ucunda ATPaz domainine, karboksil ucunda ise, substrat bağlama domainine sahiptir (Gething 1999). BiP, katlanmamış proteinlere karboksil ucundaki substrat bağlama domaini sayesinde bağlanır ve amino ucundaki ATPaz domaini aracılığıyla ATP hidrolizi sonucu, proteinde yapısal değişim meydana getirerek proteinin katlanmasını sağlamaktadır (Zhang ve Kaufman 2004, Schröder ve Kaufman 2005b, Yoshida 2007). Katlayamadığı proteinleri ise, proteazomlarda yıkılmak üzere, ER-ilişkili protein degradasyonu (ERAD) adı verilen özel bir mekanizma ile sitoplazmaya göndermektedir (Zhang ve Kaufman 2004, Yoshida 2007). Stres uyarısı olmadığı durumlarda BiP, ER membranı üzerinde bulunan ve

ER stresini algılayan PERK, IRE1 ve ATF6 transmembran protein kinazların lümenal bölgelerine bağlı konumdadır. Lümen içerisinde katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucu BiP, bu sensör proteinlerden ayrılarak aktive olmalarına izin verir ve ER stresine cevaben ilgili stres düzenleyici yolların devreye girmesini sağlar (Zhang ve Kaufman 2004, Xu ve ark. 2005). Protein katlama durumundaki değişikliklere göre, bu proteinler bazen ayrı, bazen de kesişen yolları aktive ederler (Hummasti ve Hotamisligil 2010). UPR sinyal ağı ilk olarak, tip I transmembran protein kinazlar olan PERK ve IRE1'in aktivasyonu ve ardından tip II transmembran protein kinaz olan ATF6'nın aktivasyonu ile başlatılır (Kaufman 2002, Schröder ve Kaufman 2005a, Lin ve ark. 2008, Ozcan ve ark. 2008).

Endoplazmik retikulum transmembran proteinlerinin ilki olan PERK, BiP'in ayrılması ile homodimer oluşturur (Boyce ve Yuan 2006, Todd ve ark. 2008). Dimerleşen proteinler birbirlerini fosforilleyerek aktive olur (Kohn 2010). PERK aktivasyonunun iki önemli sonucu vardır: Birincisi, ökaryotik translasyon başlama faktörlerinden ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α (eIF2 α)'nın α alt ünitesinin fosforilasyonu, ikincisi de, bazik lözün fermuar (bZIP) transkripsiyon faktörlerinden CNC (cap "n" collar) alt ailesine ait nükleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2)'nin fosforilasyonudur. eIF2 α 'nın PERK tarafından fosforilasyonu eIF2 α 'yı inaktive eder. Bunun sonucunda translasyonun başlaması için gerekli olan eIF2-GTP-tRNA^{Met} kompleksi oluşamaz ve genel protein translasyonu durur (Zhang ve Kaufman 2004, Yoshida 2007). Translasyon inhibe olduğunda kısa ömürlü proteinler hücreden temizlenir (Schröder ve Kaufman 2005a). Böylelikle, stres durumunda olan ER'nin iş yükü azaltılmış olur (Zhang ve Kaufman 2004, Yoshida 2007). Harding ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada, *in vitro* ortamda PERK'i aktive etmek için çeşitli ajanlar kullanmışlar, fakat PERK-/- hücrelerde translasyon oranının düşmediğini ortaya koymuşlardır. Translasyonun azalması, yarılanma ömrü kısa olan nükleer faktör inhibitörü kappa B (I κ B) ve NF- κ B arasındaki oranın değişmesine ve bunun sonucunda NF- κ B'nin serbest kalarak nükleusa göç etmesine neden olur (Zhang ve Kaufman 2008, Gregor ve Hotamisligil 2007). Diğer taraftan, fosforillenen eIF2 α , şaperon proteinlerin (Shen ve ark. 2004), yanlış katlanan proteinleri degrade eden ERAD'ın (Travers ve ark. 2000) ve proapoptotik transkripsiyon faktörü olan CHOP'un ekspresyon seviyesini artırmak için aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4)'ün translasyonunu artırır (Hummasti ve Hotamisligil 2010). ATF4, bir taraftan kaspaz-3 aktivasyonu ile stres altındaki hücreyi apoptoza yönlendirirken, diğer taraftan antioksidan yanıt genlerinin ekspresyon seviyesini

artırır ve hücre içi homeostazı sağlamaya çalışır (Zhang ve Kaufman 2004, Ron ve Walter 2007, Yoshida 2007, Kapoor ve Sanyal 2009). ER stresinin ilerleyen aşamasında, ER stresi sonrası düzelmeyi sağlayabilmek için PERK sinyali zayıflatılır. Bunun için ATF4 tarafından DNA hasarı ile tetiklenebilir protein 34 (GADD34) uyarılır. GADD34, eIF2 α 'nın α alt ünitesinin defosforilasyonunu sağlayarak translasyonel inhibisyonu ortadan kaldırır (Ma ve Hendershot 2003).

Endoplazmik retikulum transmembran proteinlerinin ikincisi olan IRE1'in memelilerde iki izoformu bulunur. IRE1 α , bütün dokularda bulunurken, IRE1 β sadece bağırsak epitelinde bulunur (Yokouchi ve ark. 2008). IRE1, BiP'in ayrılması ile homodimer oluşturur ve dimerleşen proteinler birbirlerini fosforilleyerek aktive olur (Zhang ve Kaufman 2004, Ron ve Walter 2007). Aktif hale gelen IRE1, sitoplazmadaki endoribonükleaz domaini ile bir transkripsiyon faktörü olan X-kutusu bağlayıcı protein 1 (XBP1) mesajcı RNA (mRNA)'sını kırarak, yaklaşık 26 nükleotidlik bir intron parçasını çıkartır. Alternatif kırılma sonucu üretilen X-kutusu bağlayıcı protein 1'in splayed edilmiş formu (XBP1s) ise, katlanmada görev alan ER şaperon genlerinin, ER genişlemesini sağlayan genlerin (Urano ve ark. 2000) ve ERAD ile ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive ederek ER işlev kapasitesini artırıcı ve ER stresini engelleyici rol oynar (Lee ve ark. 2003, Schröder ve Kaufman 2005a, Boyce ve Yuan 2006). Böylece ER üzerindeki yük azalır ve ER homeostazı korunmuş olur (Patil ve Walter 2001). Diğer taraftan IRE1'in aktif sitoplazmik kinaz alt birimine TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2)'nin bağlanmasıyla oluşan TRAF2-IRE1 kompleksi, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve I κ B kinaz (IKK)'nın fosforillenmesini sağlar. Fosforillenen JNK, bir transkripsiyon faktörü olan AP-1'i fosforilleyerek aktive eder. Fosforillenen IKK ise, I κ B'yi fosforilleyerek degradasyonunu başlatır. Bunun sonucunda serbest kalan NF- κ B ve aktive olan AP-1 nükleusa geçerek inflamasyonla ilgili genlerin transkripsiyonunu başlatır (Gregor ve Hotamisligil 2007, Zhang ve Kaufman 2008).

Endoplazmik retikulum transmembran proteinlerinin üçüncüsü olan ATF6, sitozolik bölgesi transkripsiyon faktörü olarak görev yapan tip II transmembran proteindir (Haze ve ark. 2001). ATF6'nın lümenal bölgesinde golgi lokalizasyon sekans 1 (GLS1) ve golgi lokalizasyon sekans 2 (GLS2) olarak adlandırılan golgi kompleksine lokalizasyon sinyalleri bulunur. BiP GLS1'e bağlı durumda iken, ATF6'yı ER membranında tutar. Fakat ER lümeninde katlanmamış proteinlerin artmasıyla BiP GLS1'den ayrılır ve GLS2 aktive olarak ATF6'nın golgi kompleksine göçünü uyarır. Golgi kompleksinde, bir serin proteaz olan

proteaz bölgesi 1 (S1P) ATF6'nın lümenal bölgesini, bir metalloproteaz olan proteaz bölgesi 2 (S2P) ise, transmembran bölgesini keserek ATF6'nın bZIP domaininin serbest kalmasını ve sitozolik fragmentinin (ATF6N) ortaya çıkmasını sağlar (Haze ve ark. 2001, Todd ve ark. 2008). Böylece, serbest haldeki ATF6N nükleusa giderek protein katlanması ile ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive eder ve ER'nin katlama kapasitesini artırır (Malhotra ve Kaufman 2007b). Yapılan çalışmalar, ATF6'nın aktivasyonunun, XBP1'in kırılmasından önce olduğunu; hücrenin ilk olarak ER şaperon miktarını artırarak katlanmamış proteinleri katlamaya çalıştığını, daha sonra XBP1 aracılığıyla ERAD'ın transkripsiyonunu aktive ederek katlanmamış proteinleri degrade ettiğini ortaya koymuştur (Yoshida ve ark. 2003).

2.1.5.1. Oksidatif Stres-ER Stresi İlişkisi

Organik ve inorganik oksidanlar, hücre membranını geçebilir ve antioksidan savunma, inflamasyon, enerji metabolizması, protein sentezi, apoptoz ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan çeşitli genlerin ekspresyonunu değiştirebilen UPR'yi indükleyebilmektedir. Oksidatif stres önce hafif bir protein oksidasyonuna yol açar, bu da ER içerisinde proteinlerin yanlış katlanmasına neden olur (Balch ve ark. 2014). Stres devam ederse, oksidasyon normalde proteinlerin içine gömülü halde olan hidrofobik rezidüleri hedef alır ve proteinlerin oksitlenmesine neden olur. Bu da, protein agregatlarının oluşumuna yol açar. Okside olmuş proteinler proteazom tarafından degrade edilir, ancak bu işlem okside olmuş protein oluşum hızı proteazomal kapasiteyi aştığında veya proteazomun aktivitesi azaldığında bozulabilir. Bu durumda, oluşan agregatlar proteazomun aktivitesini inhibe eder ve fonksiyon kaybına neden olur (Daniela ve ark. 2015).

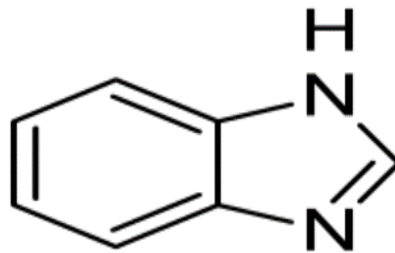
2.1.5.2. KOAH-ER Stresi İlişkisi

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım gibi kronik hastalıklarda ER stresine katkıda bulunabilecek en önemli faktör sigara dumanının (Somborac-Bacura ve ark. 2013) neden olduğu oksidatif strestir (Hassan ve ark. 2012). Uzun süreli sigara kullanımı, hücre içindeki ROS miktarını artırmaktadır. Artan ROS, solunum epitel hücrelerinin endoplazmik

retikulumunda proteinlerin yanlış katlanmasına ve UPR'nin aktivasyona neden olmaktadır. Katlanmamış protein cevabı, protein metabolizması, inflamasyon, otofaji, hücre sağ kalımı ve antioksidan savunmadaki rolü nedeniyle, KOAH patogenezinde büyük öneme sahiptir. Sigara dumanına maruz bırakılan farelerde olduğu gibi, KOAH'lı insanların akciğerlerinde de poliubikitinleşmiş, yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin miktarında artış olduğu gösterilmiştir (Min ve ark. 2011, Tran ve ark. 2015).

2.1.6. Benzimidazoller

Benzimidazol, heterosiklik bir aromatik organik bileşiktir. Bu bileşik, benzen ve imidazol halkasının füzyonundan oluşan bisiklik bir bileşiktir (Şekil) (Barker ve ark. 1960). Doğada en bilinen benzimidazol bileşiği, B12.1 vitaminde kobalt için eksenel bir ligand görevi gören N-ribosil-dimetilbenzimidazol'dür. Tıbbi bileşiklerde önemli bir farmakofor olan benzimidazol yapısının bulunması, o bileşiğin geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip çok yönlü bir heterosiklik yapı olmasını sağlamaktadır (Narasimhan ve ark. 2012). Kubo ve ark. (1990) çeşitli benzimidazol türevleri olan florin, propilen, tetrahidrokinolin ve siklize bileşikleri yer değiştirerek çeşitli bileşikler sentezlemişler ve bu bileşiklerin stabilite ve biyoyararlanım bakımından önemli biyolojik aktiviteye sahip bileşikler olduğunu ortaya koymuşlardır (Kubo ve ark. 1990).



Şekil 2.5. 1H-benzimidazol yapısı (Barker ve ark. 1960)

Benzimidazol türevleri, nükleotidlerin yapısal izosterleridir ve canlı sistemde sayısız biyolojik faaliyetlerden ve işlevlerden sorumlu olan biyopolimerler ile kolayca etkileşime girmektedirler (Narasimhan ve ark. 2012). Aynı zamanda benzimidazol türevlerinin, antimikrobiyal (Eisa ve ark. 2010), antikanser (Styskala ve ark. 2008), antiviral (Hayes ve ark. 2008), antiparaziter (Gellis ve ark. 2008), antihipertensif (Shah ve ark. 2008), antiinflamatuvar (Gaba ve ark. 2010), antidiyabetik (Shingalapur ve ark. 2010) ve antioksidan (Nakano ve ark. 1999) gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hücre Hattı

Çalışmada, insan bronş epitel hücre hattı (BEAS-2B) kullanıldı. BEAS-2B hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC®)'den temin edildi.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan çözelti ve kimyasal maddeler Çizelge 3.1.'de verildi.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan çözelti ve kimyasal maddeler

Kimyasal Adı	Markası
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1X) (DMEM)	Gibco
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Hank's Balanced Salt Solution (1X) (HBSS)	Gibco
Trypsin/EDTA (1X)	Gibco
Phosphate bufftered saline (1X) PBS	Gibco
Penicilin/Streptomycin (10.000 Units/mL penicilin) (10.000 µg/mL streptomycin)	Gibco
Tripan Mavisi Boyası (% 0.4)	Gibco
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma
Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂)	Merck
RIPA Lysis Buffer	Santa Cruz
1-Butanol	Merck

Pyridine	Merck
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma
Asetik asit	Merck
1,1,3,3-Tetraethoxypropane	Sigma
2-Thiobarbituric Acid (TBA)	Merck
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad
β-merkaptoetanol	Merck
10X Tris/Glycine/SDS (TGS) Buffer	Bio-Rad
5X Transfer Buffer	Bio-Rad
10X Tris-Buffered Saline (TBS) Buffer	Bio-Rad
Tween-20	Sigma
Skim Milk Powder (Yağsız süt tozu)	Sigma
Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards	Bio-Rad
%4-20 Mini-PROTEAN®TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 50 μL	Bio-Rad
Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs	Bio-Rad
Ponceau S	Sigma
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad

3.1.3. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.2.'de verildi.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Markası
Biyogüvenlik Kabini	Thermo, HeraSafe KS Class II
Karbondioksit İnkübatörü	Thermo, HeraCell 150i
Hassas Terazı	OHAUS, Pioneer PA214C
Işık Mikroskobu	Novel, N-120
İnverted Mikroskop	Nikon, Eclipse TS100

pH Metre	HANNA Instruments, HI 2211 pH/ORP Meter
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Spektrofotometre	Thermo, Multiskan GO
Su Banyosu	Stuart, SWBD
Ultrasonik Homojenizatör	Elma, Elmasonic S 40
-20°C Derin Dondurucu	Bosch
+4°C Derin Dondurucu	Bosch
Soğutmalı Santrifüj	Sigma, 3-30K
Manyetik Karıştırıcı-Isıtıcı	Heidolph, MR Hei-Standard
-80°C Derin Dondurucu	DAIHAN, SimpleFreez U500
Vorteks	VELP Scientifica, Classic
Kuru Blok Isıtıcı	WiseTherm® HB-96D
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter, Microfuge 20R
Thermal Cyclers	Bio-Rad, T100
Mikrosantrifüj	DAIHAN, Centrifuge CF-5
Real-time PCR Cyclers	Qiagen, Rotor Gene Q
Otoklav	DAIHAN, MaXterile 47
Saf Su Cihazı	Merck, Millipore Direct-Q® 3UV
Western Blot Jel Tankı	Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System
Güç Kaynağı	Bio-Rad PowerPac HV
Western Blot Transfer Cihazı	Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™ Transfer System
Çalkalayıcı	IKA® Rocker 2d Digital
Kemilüminesans Görüntüleme Sistemi	Bio-Rad Chemi Doc MP

3.1.4. Ticari Kitler

Çalışmada kullanılan ticari kitler Çizelge 3.3.'te verildi.

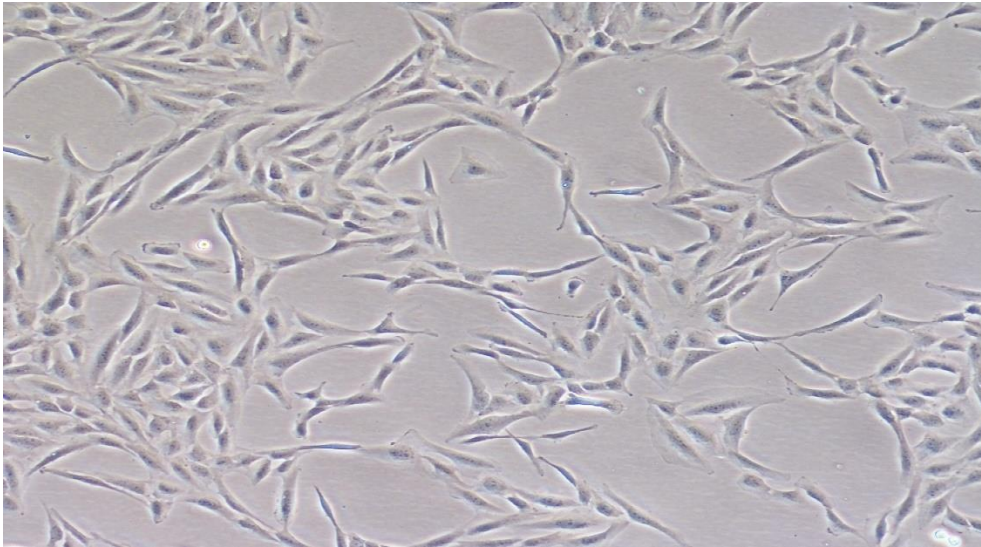
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan ticari kitler

Ticari Kitin Adı	Markası
Pierce BCA (Bicinchoninic acid) Protein Assay Kit	Thermo
RNeasy Mini Kit	Qiagen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo
Applied Biosystems Power SYBR Green PCR Master Mix	Thermo

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

BEAS-2B hücreleri (Şekil 3.1), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Catalog number: 11965092), % 10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Catalog number: 16000044) ve % 1 Penicilin/Streptomisin (Gibco, Catalog number: 15140122) içeren vasatta (Complete medium; CM) % 95 nem, % 5 CO₂ ve 37°C koşulları sağlayan inkübatörde üretildi. Kültür vasatı haftada iki kez değiştirildi ve hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında deneylerde kullanıldı.



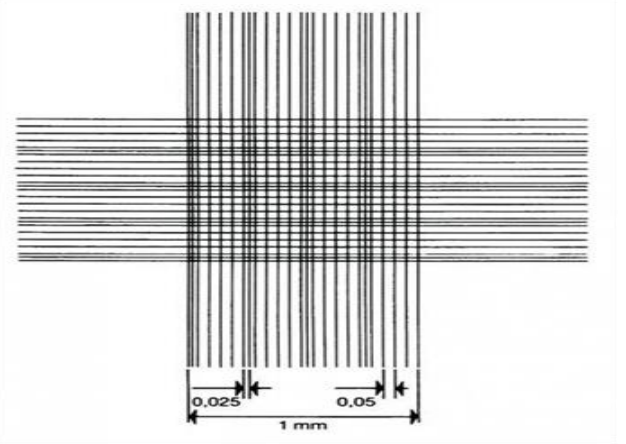
Şekil 3.1. BEAS-2B hücre morfolojisi

3.2.2. Hücre Sayımı

Uygun koşullarda kültüre edilen hücrelerin sayımında Tripan mavisi boyası (Gibco, Catalog number: 15250061) testi uygulandı. Buna göre, 50 mikrolitre (μL) hücre ile 50 μL boya karıştırılarak ışık mikroskobu altında hücrelerin canlılıkları ve sayıları Thoma lamı (Şekil 3.2) kullanılarak değerlendirildi. Thoma lamında bulunan 4x4'lük karelerden oluşmuş (Şekil 3.3) iki alandaki hücreler sayıldı. Tripan mavisi boyası testi gereğince, boyayı içine alıp mavi renkte boyanan hücreler ölü olarak, boyayı içine almayanlar ise canlı olarak değerlendirildi. İki alanda sayılan canlı hücre toplamının ortalaması alındı. Çıkan sayı, dilüsyon faktörü ile çarpılarak Thoma lamının hacmine (1 mm x 1 mm x 0,1 mm) bölündü. Böylelikle 1 mililitre (mL) başına düşen canlı hücre sayısı hesaplandı. Bu sayı, 1 mL'de ekilmek istenen hücre sayısına bölünerek yeni dilüsyon faktörü elde edildi. İstenen total solüsyon hacmi yeni dilüsyon faktörüne bölünerek ana stoktan alınması gereken hücre miktarı hesaplandı.



Şekil 3.2. Thoma lamı



Şekil 3.3. Thoma lamında hücre sayımı yapılan alan

3.2.3. Hidrojen Peroksitin ve Benzimidazol Türevi Bileşiğın Süspansiyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck, Catalog Number: 108600), % 1 penisilin/streptomisin takviye edilmiş DMEM (FBS içermeyen serum-free medium; SF) içerisinde 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100 ve 200 mikromolar (μM) konsantrasyonlarda hazırlandı.

Benzimidazol türevi bileşik (RHE-231), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma, CAS number: 67-68-5) içerisinde çözdürüldü. Daha sonra, % 1 penisilin/streptomisin takviye edilmiş SF içerisinde 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 μM konsantrasyonlarda hazırlandı.

3.2.4. Hücre Canlılığı Analizi

BEAS-2B hücreleri, 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (Thermo) her bir kuyuya 100.000 hücre/mL olacak şekilde, hücre tipine uygun CM içerisinde ekildi. Hücreler kuyucukların tabanını % 70-80 oranında kapladığında, SF içerisinde 24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra, SF ile hazırlanan farklı konsantrasyonlarda (0-200 μM) H_2O_2 'ye farklı zamanlarda (24 ve 48 saat) ve yine SF ile hazırlanan farklı konsantrasyonlarda (0-100 μM) RHE-231'e 24 saat maruz bırakıldı. İnkübasyon sonunda, hücrelerin canlılığı, sarı renkli tetrazolium tuzu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, CAS number 298-93-1)'nin metabolik aktivitenin bir göstergesi olan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) bağımlı oksidoredüktazlar aracılığıyla mor renkli formazana indirgenmesi esasına dayanan ve bu şekilde canlı hücre sayısını yansıtan yöntem ile değerlendirildi. Kültür kaplarının tabanına yapışık olarak kalan hücreler 1 mg/mL MTT ile 60 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda MTT solüsyonu uzaklaştırıldı ve oluşan formazanın çözünbilmesi için hücreler DMSO ile muamele edildi. Renk değişimi spektrofotometre ile 595 ve 670 nanometre (nm) dalga boylarında ölçülerek, iki dalga boyu arasındaki absorbans farkı alındı (Mosmann 1983). Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, her örnek duplike olarak çalışıldı.

3.2.5. Biyokimyasal Analizler

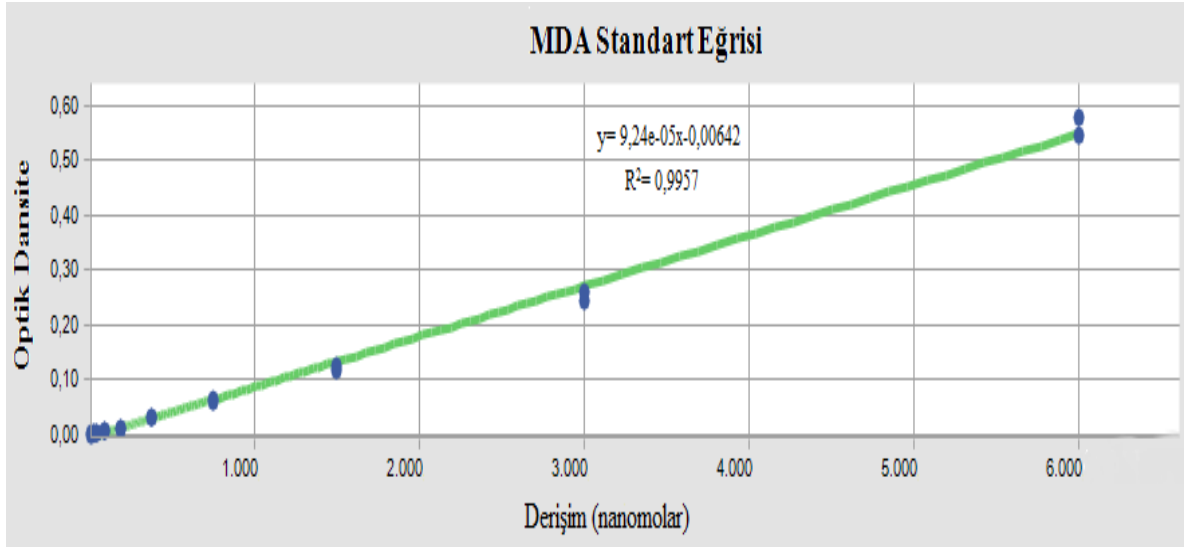
3.2.5.1. Malondialdehit (MDA) Analizi

BEAS-2B hücreleri Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, Catalog number: 10010023) ile yıkandı. Hücrelerin parçalanması için Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Lysis Buffer (Santa Cruz, Catalog number: sc-24948) eklendi. RIPA Buffer eklenmeden önce içerisine 1 mL RIPA Lysis Buffer için, 10 µL 200 milimolar (mM) PMSF (Santa Cruz, Catalog number: sc-24948), 10 µL 100 mM sodium orthovanadate (Santa Cruz, Catalog number: sc-24948) ve 10 µL protease inhibitor cocktail (Santa Cruz, Catalog number: sc-24948) eklendi. Elde edilen hücre lizatı MDA analizi için kullanıldı.

Malondialdehit, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Lipid peroksitleri pH: 3.5'te 95°C'de tiyobarbitürik asit (TBA) (Merck, CAS number: 504-17-6) ile inkübasyonu sonucu pembe-kırmızı renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile MDA miktarı saptanır (Ohkawa ve ark. 1979). Yöntemde, % 8.1 sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma, CAS number: 151-21-3), % 20 Asetik asit (Merck, CAS number: 64-19-7), % 0.8 TBA çözeltileri ile muamele edilen örnek numuneleri 95°C'de inkübe edilip soğumaya bırakıldı. Daha sonra, n-bütanol (Merck, CAS number: 71-36-3)/piridin (Merck, CAS number: 110-86-1) çözeltisi eklenen örnek tüpleri, 4000 rpm'de santrifüj (Sigma, 3-30K) edildi. Üst faz spektrofotometrede kullanılarak 532 nm'de ölçüldü. Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, her örnek duplike olarak çalışıldı.

3.2.5.2. MDA Standart Eğrisi

MDA standart eğrisi oluşturmak için, 1.1.3.3-Tetraetoksipropan (Sigma, CAS number 122-31-6) uygun miktarda dilüe edildi. Bu dilüsyondan 6000, 3000, 1500, 750, 375, 187.5, 93.75, 46.875, 23.43 ve 11.71 nanomolar (nM) konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Her bir standart çözeltinin absorbans değeri 532 nm'de ölçülerek standart eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.4) ve MDA miktarı nanomol (nmol) cinsinden belirlendi. Daha sonra her bir örnekteki protein miktarı ölçülerek MDA miktarı nmol/mg protein cinsinden hesaplandı (Jain 1986).



Şekil 3.4. MDA standart eğrisi

3.2.5.3. Total Protein Ölçümü

MDA ve Western Blot parametreleri ile ilgili normalizasyon hesaplamaları için total protein ölçümü Pierce BCA (Bicinchoninic acid) Protein Assay Kit (Thermo, Catalog number: 23227) kullanılarak yapıldı.

Kit içeriği

BCA Reagent A, 500 mL

BCA Reagent B, 25 mL

Albumin Standard Ampules, 2 mg/mL, 10 x 1 mL

Protokol

1. İlk olarak BCA Reagent A/BCA Reagent B 50/1 oranında olacak şekilde, örnek sayısına göre hesaplanarak karıştırıldı ve BCA çalışma solüsyonu hazırlandı.
2. Aşağıdaki tabloda verilen hacimlere uygun olarak standart solüsyonları hazırlandı.

Standart tüpleri	Dilüent hacmi (µL)	BSA (Bovine serum albumin) kaynağı ve hacmi (µL)	Final BSA konsantrasyonu (µg/mL)
A	0	Stoktan 300	2000
B	125	Stoktan 375	1500
C	325	Stoktan 325	1000
D	175	B tüpünden 175	750
E	325	C tüpünden 325	500
F	325	E tüpünden 325	250
G	325	F tüpünden 325	125
H	400	G tüpünden 100	25
I	400	0=Blank	0=Blank

3. Hazırlanan standart solüsyonları duplike olarak her mikrolaka (microplate) kuyusuna 25 µL eklendi.
4. Daha sonra protein konsantrasyonu bilinmeyen örnekler her kuyuya 25 µL olacak şekilde eklendi.
5. Her kuyuya 200 µL BCA çalışma solüsyonu eklendi ve mikrolaka 30 saniye boyunca yavaşça çalkalandı.
6. Mikrolaka'nın üzeri kapatıldı ve 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrasında mikrolaka'nın 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü yapıldı.

3.2.6. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

RNA izolasyonu için hücreler flask tabanından Tripsin-EDTA (1X) (% 0.25) ile kaldırılarak toplandı. RNA izolasyonu (Qiagen; RNeasy Mini Kit, Catalog number: 74104) ve cDNA sentezi (Thermo; High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Catalog number: 4368814) aşamaları ticari kit kullanılarak yapıldı.

3.2.6.1. RNA İzolasyonu

Kit içeriği

RNeasy Mini Spin Columns

Collection Tubes (Toplama tüpleri) (1.5 mL)

Collection Tubes (Toplama tüpleri) (2 mL)

Buffer RLT (45 mL)

Buffer RW1 (45 mL)

Buffer RPE (11 mL)

RNase-Free Water (RNaz içermeyen su) (10 mL)

Protokol

1. Hasat edilen hücrelerin üzerine 600 µL Buffer RLT eklendi.
2. Hücreler vortekslenerek parçalandı.
3. Homojenize edilmiş lizata 600 µL % 70'lik etanol eklendi.
4. Lizat ve etanol karışımından 700 µL çekildi ve 2 mL'lik toplama tüpleri içindeki RNeasy Mini Spin Column tüplere aktarıldı. Tüplerin kapakları kapatılarak oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüj edildi.
5. RNeasy Mini Spin Column tüplere 700 µL Buffer RW1 eklendi. Tüplerin kapakları kapatılarak oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüj edildi.
6. RNeasy Mini Spin Column tüplere 500 µL Buffer RPE eklendi. Tüplerin kapakları kapatılarak oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüj edildi.
7. RNeasy Mini Spin Column tüplere 500 µL Buffer RPE eklendi. Tüplerin kapakları kapatılarak oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüj edildi.
8. RNeasy Mini Spin Column tüpleri yeni 1.5 mL'lik toplama tüplerine transfer edildi. 30-50 µL RNaz içermeyen su eklendi. Tüplerin kapakları kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Toplama tüplerindeki saflaştırılan RNA örneklerinin konsantrasyonu ve A_{260}/A_{280} absorbans oranı nükleik asit ölçer (Thermo, Multiskan GO) ile belirlenerek cDNA sentezi için kullanıldı.

3.2.6.2. cDNA Sentezi

Kit içeriği

10X RT Buffer, 1 × 1 mL
10X RT Random Primers, 1 × 1 mL
25X dNTP Mix (100 mM), 1 × 0.2 mL
MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/μL), 2 × 0.1 mL

Protokol

2X RT master mix bileşenleri	Eklenen hacim (μL)
10X RT Buffer	2
10X RT Random Primers	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8
MultiScribe® Reverse Transcriptase	1
RNaz içermeyen su	4.2
Toplam	10 μL

1. Her bir örnek için 10 μL 2X RT master mix solüsyonu eklendi.
2. Her tüpe 10 μL RNA örneği eklendi.
3. Tüpler etiketlendi, aşağıda verilen koşullarda inkübe edildi.

Sıcaklık	Zaman
25°C	10 dakika
37°C	120 dakika
85°C	5 dakika
4°C	∞

4. İnkübasyon sonrası her tüpe 80 μL RNaz içermeyen su eklendi. Örnekler kullanılıncaya kadar uygun koşullarda saklandı.

3.2.7. Real-time PCR

Ticari kit ile elde edilen cDNA örnekleri kullanıldı. Real-time PCR deneyleri üreticinin talimatları doğrultusunda ticari kit (Thermo; Applied Biosystems Power SYBR Green PCR Master Mix, Catalog number: 4367659) kullanılarak yapıldı. Çalışmada kullanılan PERK, ATF6, IRE1 α ve GRP78 genlerine ait primer dizileri (Chou ve ark. 2018) Çizelge 3.4’te verildi. Housekeeping gen olarak kullanılan β -aktin genine ait primer ise, ticari olarak (Qiagen) satın alındı. Spesifik olmayan ürünleri ve primer-dimer varlığını kontrol etmek için melting curve analizi yapıldı. Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, her örnek duplike olarak çalışıldı. Deney sonuçları kat değişimi (Fold-change) olarak verildi.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primerler

Genler	Primerler	Kaynak
PERK	Forward: 5’-TGTCGCCAATGGGATAGTGACGAA-3’ Reverse: 5’-AATCCGGCTCTCGTTTCCATGTCT-3’	(Chou ve ark. 2018)
ATF6	Forward: 5’-ATGTCTCCCCCTTTCCTTATATGGT-3’ Reverse: 5’-AAGGCTTGGGCTGAATTGAA-3’	(Chou ve ark. 2018)
IRE1α	Forward: 5’-GGGAAATACTCTACCAGCCT-3’ Reverse: 5’-GAAATCTCTCCAGCATCTTG-3’	(Chou ve ark. 2018)
GRP78	Forward: 5’-CAACCCCGAGAACACGGTC-3’ Reverse: 5’-CTGCACAGACGGGTCATTC-3’	(Chou ve ark. 2018)

Kit içeriği

Power SYBR Green PCR Master Mix (2X), 5 mL

Protokol

1. Her bir örnek tüpüne 12.5 μ L Power SYBR Green PCR Master Mix, 100 nM primer, 6 μ L RNaz içermeyen su ve 100 ng cDNA eklenerek tüplerin kapakları kapatıldı.

2. Tüpler cihaza yerleştirilerek aşağıda verilen koşullarda inkübe edildi.

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
95°C	10 dakika	1
95°C	15 saniye	40
60°C	60 saniye	40

3.2.8. Western Blot Analizi

3.2.8.1. Protein İzolasyonu

Proteinlerin izolasyonu için hücreler PBS (1X) ile yıkandı. Hücreleri parçalamak için RIPA Lysis Buffer kullanıldı. RIPA Lysis Buffer eklenmeden önce içerisine; 1 mL RIPA Lysis Buffer için, 10 µL 200 mM PMSF, 10 µL 100 mM sodium orthovanadate ve 10 µL protease inhibitor cocktail eklendi. Daha sonra, her bir flaska 2 mL RIPA Lysis Buffer karışımından eklendi. 15 dakika +4°C’de çalkalandı. Hücreler kazıyıcı ile kazındı. Elde edilen hücre süspansiyonu falkon tüplere aktarıldı ve +4°C, 10 000 x g’de, 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar yeni tüplere aktarılarak protein miktarları ölçüldü.

3.2.8.2. Protein Konsantrasyonunun Ölçümü

3.2.8.2.1. BSA Standartlarının Ölçümü

Örneklerdeki protein miktarlarını belirlemek amacıyla BSA proteini 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0=Blank µg/mL olacak şekilde hazırlanarak standart eğri grafiği çizildi.

3.2.8.2.2. Total Protein Ölçümü

Western Blot parametreleri için her bir örnekteki total protein miktarı, BCA Protein protein tayin yöntemini esas alan Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo, Catalog number: 23227) kullanılarak belirlendi. Bunun için ilk olarak, BCA Reagent A/BCA Reagent B 50/1 oranında, örnek sayısına göre hesaplanarak karıştırıldı ve BCA çalışma solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan standart solüsyonları, duplike olarak, 96 kuyucuklu plate'in her kuyucuğuna 25 µL olacak şekilde eklendi. Protein konsantrasyonu bilinmeyen örnekler de her bir kuyuya 25 µL olacak şekilde eklendi. Daha sonra her kuyuya 200 µL BCA çalışma solüsyonu eklendi ve plate 30 saniye boyunca yavaşça çalkalandı. Plate'in üzeri kapatıldı ve 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 562 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapıldı.

3.2.8.3. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ve Proteinlerin Transferi

3.2.8.3.1. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

Protein örnekleri jele yüklenmeden önce, 4X Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Catalog number: 1610747) ile β-merkaptoetanol (Merck, Catalog number: 8057400250) 9/1 oranında karıştırılarak mix hazırlandı. Toplam protein miktarı 50 mikrogram (µg) olacak şekilde, hazırlanan bu mix ile örnekler 4/1 oranında karıştırıldı. Ardından, protein denatürasyonu için örnekler kuru blok ısıtıcıda 95°C'de 10 dakika inkübe edildi. Bu esnada jel, elektrofrez tankına (Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System) yerleştirildi. Tank içerisine doluluk sınırına kadar 1X TGS Buffer eklendi. Marker (Bio-Rad, Catalog number: 1610376) (5 µL) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklenerek 30 dakika 200V'ta elektrofrez işlemi (Bio-Rad PowerPac HV) gerçekleştirildi. İnternal kontrol olarak β-aktin kullanıldı.

3.2.8.3.2. Proteinlerin Transferi

Transfer işlemi için Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) cihazı kullanıldı. Üreticinin talimatları doğrultusunda Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad, Catalog number: 1704156) sırasıyla anot (+), bottom ion reservoir stack, membran, jel, top ion reservoir stack, katot (-) olacak şekilde cihaza yerleştirildi. 3 dakika boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.2.8.4. Ponceau S Boyama

Transfer sonrasında membran pembe renkli Ponceau S solüsyonu (Sigma, Catalog number: 09189) içerisine alınarak proteinler boyandı ve transfer etkinliği değerlendirildi. Bütün bantlar net görününceye kadar membran solüsyon içerisinde tutuldu. Daha sonra membran 1X TBS-T (% 0.2) solüsyonu içerisine alındı. Pembe renk gidene kadar hafifçe çalkalandı.

3.2.8.5. Bloklama

Membran üzerindeki non-spesifik alanı bloke etmek için, membran 1X TBS-T içerisinde hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu (Sigma, CAS number: 999999-99-4) ile 1 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda, membran 1X TBS-T ile 3 defa 5 dakika süreyle yıkandı.

3.2.8.6. Birincil Antikor

ATF4 ve IRE1 α proteinleri ile internal kontrol β -aktin proteinlerine özgü birincil antikorlar (Çizelge 3.5)'te verildi. 1X TBS-T içerisinde 1:1000 olacak şekilde hazırlandı ve membran 1 gece +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 1X TBS-T ile 3 defa 5 dakika süreyle yıkama işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan birincil antikorlar

Birincil antikor adı	Üretildiği organizma	Ticari markası
IRE1α	Mouse	Thermo
ATF4	Mouse	Proteintech
β-aktin	Mouse	Thermo

3.2.8.7. İkincil Antikor

Birincil antikorlara uygun anti-mouse ikincil antikorlar (Thermo) % 5'lik yağsız süt tozu çözeltisi içerisinde 1:2000 olacak şekilde hazırlandı ve membran 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda, membran 1X TBS-T ile 5 defa 5 dakika süreyle yıkandı.

3.2.8.8. Görüntüleme

Görüntüleme solüsyonu için Peroxide Reagent (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, Catalog number: 1705061) ve Luminol/Enhancer Reagent (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, Catalog number: 1705061) kullanıldı. Membranlar hazırlanan solüsyon ile 2 dakika inkübe edildikten sonra açığa çıkan kemilüminesans sinyal, Bio-Rad Chemi-Doc cihazı kullanılarak görüntülendi.

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Hücre canlılığı ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc. USA) programı kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (One way analysis of variance, ANOVA) ile Dunnet çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanıldı. Deneyler 3 defa tekrarlandı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

MDA verilerinin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics 23 programı kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesi Man-Whitney U testi ile yapıldı. $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Real-Time PCR verilerinin istatistiksel analizi RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 ile yapıldı. Deneyler 3 defa tekrarlandı. Sonuçlar kat değişimi olarak verildi.

Western Blot verilerinin istatistiksel analizi İmageJ IJ 1.46r programı kullanılarak yapıldı. Verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc. USA) programı kullanılarak ANOVA ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi yapıldı. $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

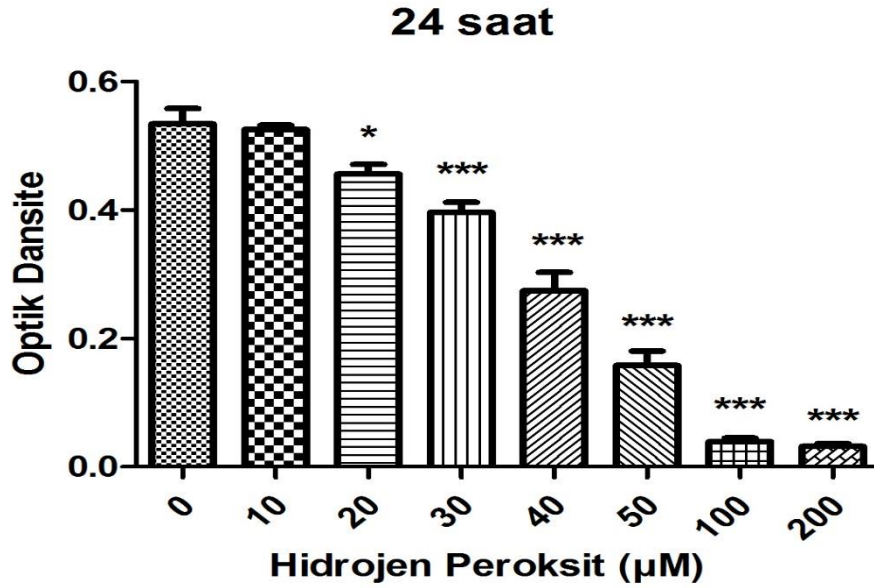


4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Analizi

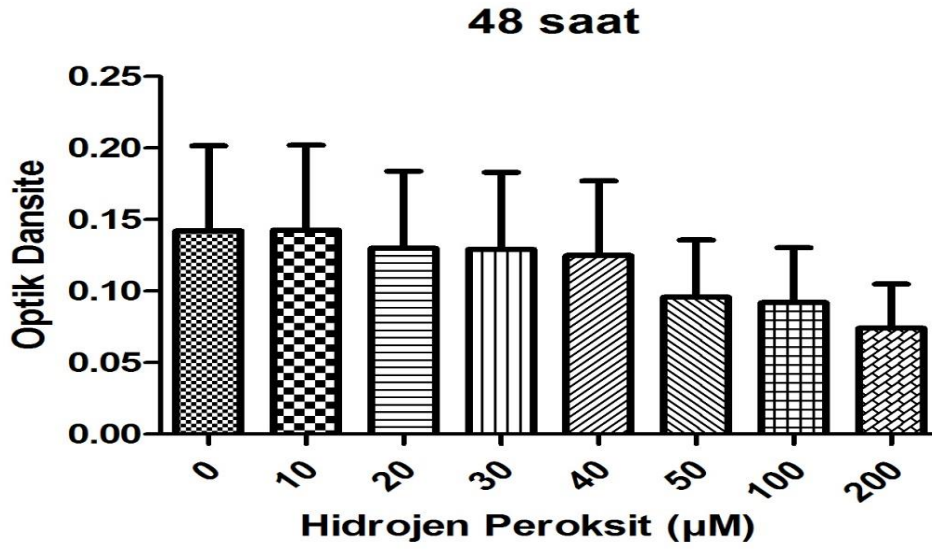
Farklı konsantrasyonlarda (0-200 μM) H_2O_2 'nin farklı sürelerde (24 ve 48 saat) BEAS-2B hücre canlılığı üzerine olan etkisi değerlendirilerek maruziyet konsantrasyonları belirlendi.

BEAS-2B hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda (0-200 μM) H_2O_2 'ye 24 saat süresince maruz bırakılması neticesinde 20, 30, 40, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarda hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$ ve $p<0.001$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. H_2O_2 'nin (24 saat) BEAS-2B hücre canlılığı üzerine etkisi (* $p<0.05$ ve *** $p<0.001$). Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

BEAS-2B hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda (0-200 μM) H_2O_2 'ye 48 saat süresince maruz bırakılması neticesinde hiçbir konsantrasyonda hücre canlılığı üzerine anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. H₂O₂'nin (48 saat) BEAS-2B hücre canlılığı üzerine etkisi. Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

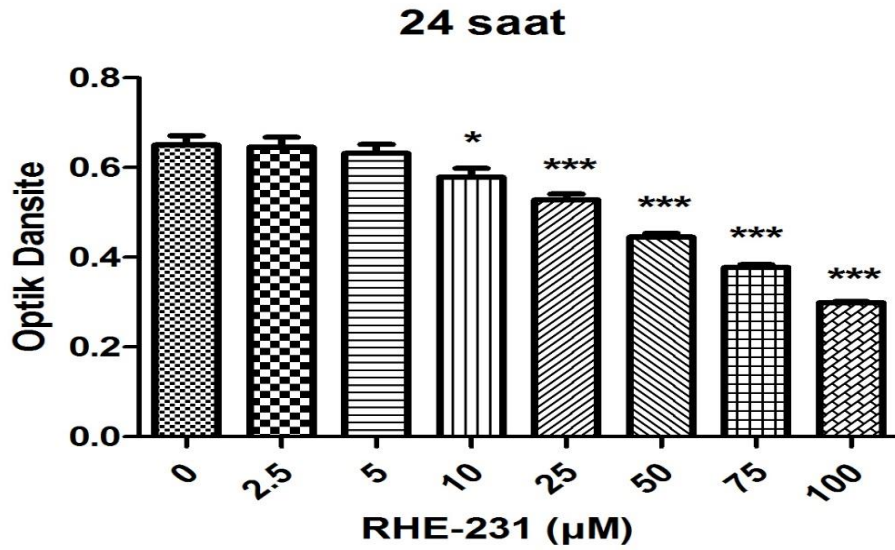
Farklı konsantrasyonlarda (0-200 µM) ve sürelerde (24 ve 48 saat) H₂O₂'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde, maruziyet süreleri sonunda elde edilen veriler doğrultusunda % canlılık değerleri hesaplandı (Çizelge 4.1). Elde edilen bütün veriler değerlendirilerek deneyler için maruziyet konsantrasyonları 10 ve 20 µM olarak, maruziyet süresi ise 24 saat olarak belirlendi.

Çizelge 4.1. H₂O₂'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde % canlılık değerleri

	% Canlılık Kontrol	% Canlılık 10 µM	% Canlılık 20 µM	% Canlılık 30 µM	% Canlılık 40 µM	% Canlılık 50 µM	% Canlılık 100 µM	% Canlılık 200 µM
24 saat	100	98.3977	85.3765	74.1798	51.3152	29.5658	7.3379	5.9916
48 saat	100	100.2210	91.2816	90.8196	87.7863	67.3162	64.7047	52.0490
% Canlılık= Örneğin Ortalama Absorbansı * 100/Kontrolün Ortalama Absorbansı								

Farklı konsantrasyonlarda (0-100 µM) RHE-231'in 24 saat süresince BEAS-2B hücre canlılığı üzerine olan etkisi değerlendirilerek maruziyet konsantrasyonları belirlendi.

BEAS-2B hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda (0-100 μM) RHE-231'e 24 saat süresince maruz bırakılması neticesinde 10, 25, 50, 75 ve 100 μM konsantrasyonlarda hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$ ve $p<0.001$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. RHE-231'in BEAS-2B hücre canlılığı üzerine etkisi (* $p<0.05$ ve *** $p<0.001$). Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda (0-100 μM) 24 saat süresince RHE-231 bileşiğine maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde, maruziyet süreleri sonunda elde edilen veriler doğrultusunda % canlılık değerleri hesaplandı (Çizelge 4.2). Elde edilen veriler değerlendirilerek deneyler için maruziyet konsantrasyonları 5 ve 10 μM olarak belirlendi.

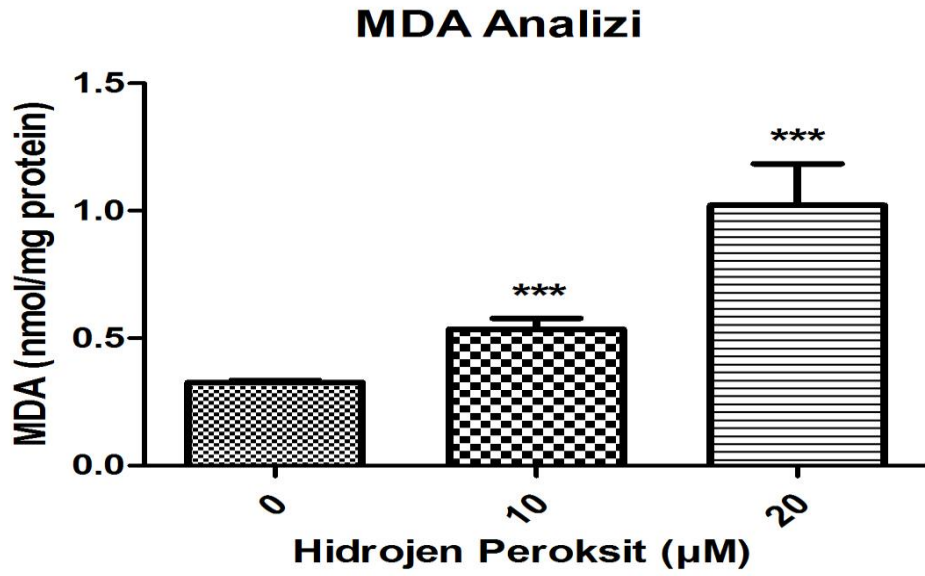
Çizelge 4.2. RHE-231 bileşiğine maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde % canlılık değerleri

	% Canlılık Kontrol	% Canlılık 2.5 μM	% Canlılık 5 μM	% Canlılık 10 μM	% Canlılık 25 μM	% Canlılık 50 μM	% Canlılık 75 μM	% Canlılık 100 μM
24 saat	100	99.3216	97.1099	89.0256	81.2907	68.4546	58.1215	45.9862
% Canlılık= Örneğin Ortalama Absorbansı * 100/Kontrolün Ortalama Absorbansı								

4.2. Biyokimyasal Analizler

4.2.1. Malondialdehit (MDA) Analizi

Yirmi dört saat süresince 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücre lizatı örneklerinde MDA ölçümü yapıldı. Hem 10 μM hem de 20 μM maruziyet konsantrasyonlarında MDA düzeyi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA düzeyleri (***) ($p<0.001$). Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

Yirmi dört saat süresince 10 μM konsantrasyonda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi istatistiksel tanımlayıcı verileri Çizelge 4.3'te gösterildi.

Çizelge 4.3. 10 μM konsantrasyonda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi tanımlayıcı verileri

MDA (10 μM)			
Maruziyet	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Ortanca	<i>p</i>
SF	0.3269 $\pm$ 0.02745	0.3315	0.000
10 μM	0.5357 $\pm$ 0.17127	0.4932	

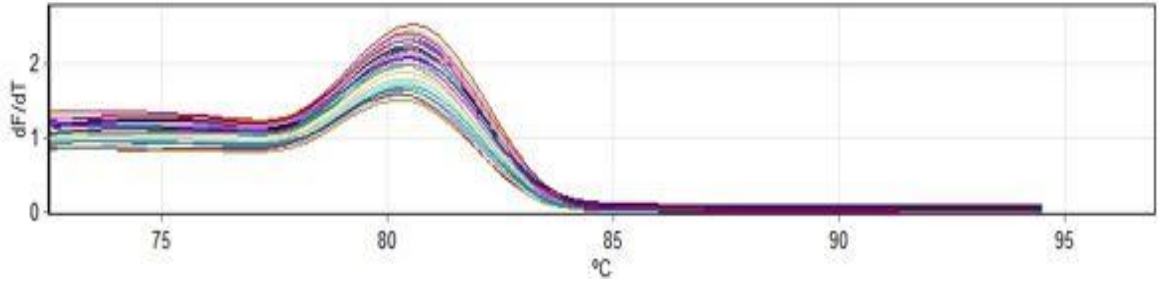
Yirmi dört saat süresince 20 μM konsantrasyonda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi istatistiksel tanımlayıcı verileri Çizelge 4.4'te gösterildi.

Çizelge 4.4. 20 μM konsantrasyonda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi tanımlayıcı verileri

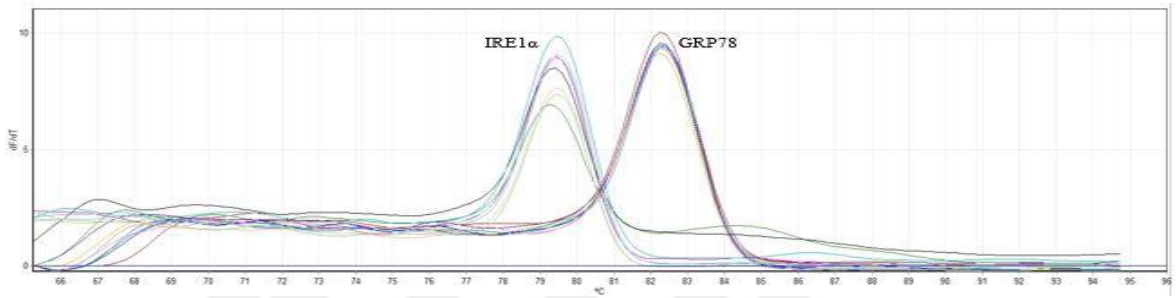
MDA (20 μM)			
Maruziyet	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Ortanca	<i>p</i>
SF	0.3269 $\pm$ 0.02745	0.3315	0.000
20 μM	1.0215 $\pm$ 0.62891	0.8515	

4.3. Gen Ekspresyon Analizi

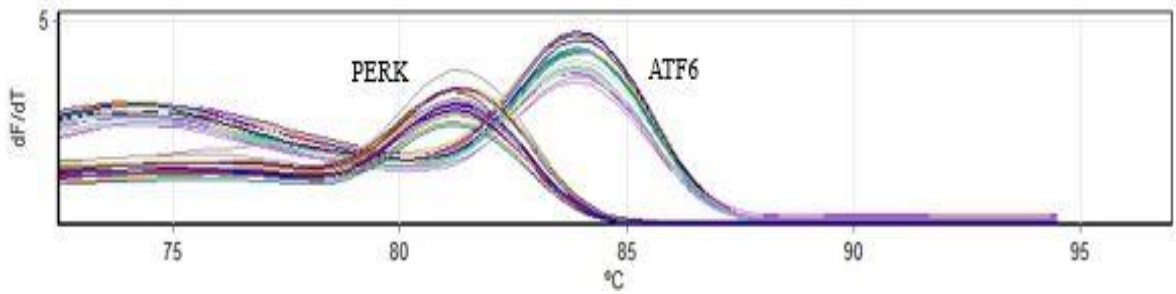
Yirmi dört saat süresince 10 μM H_2O_2 , 10 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231, 10 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231, 20 μM H_2O_2 , 20 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231 ve 20 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231'e maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinden elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak PERK, ATF6, IRE1 α ve GRP78 gen ekspresyon analizleri yapıldı. Housekeeping gen olarak β -aktin kullanıldı. Sonuçlar kat değişimi olarak verildi. Spesifik olmayan ürünleri ve primer-dimer varlığını kontrol etmek için bütün primerlere melting curve analizi yapıldı (Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.5. β -aktin primerine ait melting curve eğrisi



Şekil 4.6. IRE1 α ve GRP78 primerlerine ait melting curve eğrileri



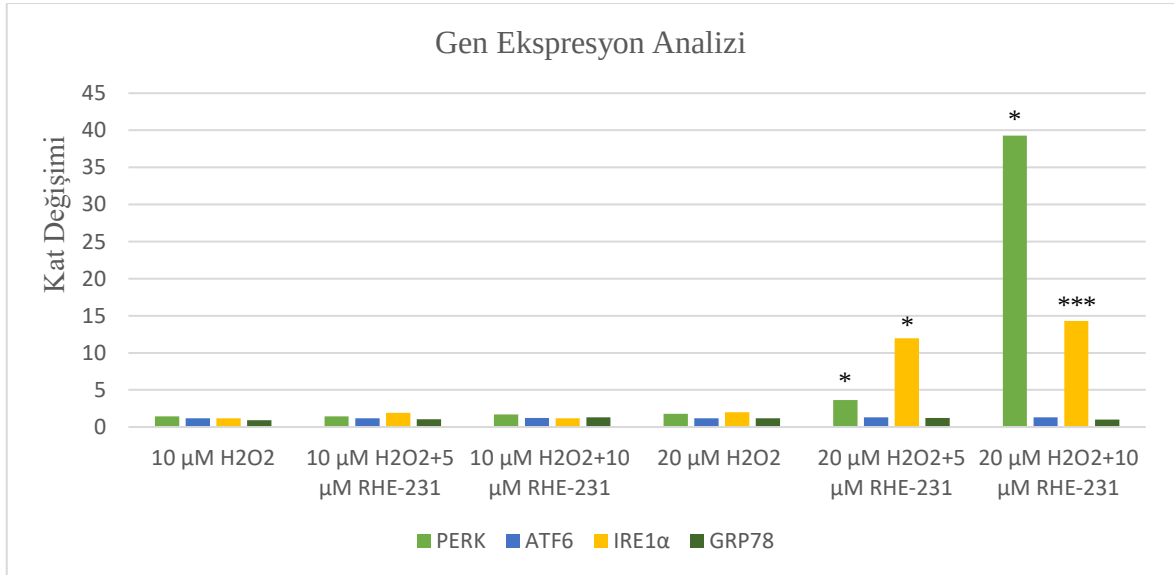
Şekil 4.7. PERK ve ATF6 primerlerine ait melting curve eğrileri

PERK, ATF6, IRE1 α ve GRP78 gen ekspresyon seviyelerinde, 10 μ M H₂O₂, 10 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231, 10 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231 ve 20 μ M H₂O₂ konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlenmez iken ($p>0.05$), IRE1 α ve PERK gen ekspresyon seviyelerinde, 20 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231 ve 20 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231 konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış bulundu (Şekil 4.8). 20 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231 konsantrasyonda IRE1 α genindeki kat değişimi değeri 11.95 ($p<0.05$) kat iken, PERK genindeki kat değişimi değeri 3.65 ($p<0.05$)

kat; 20 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231 konsantrasyonda ise IRE1 α genindeki kat değişimi değeri 14.31 ($p<0.001$) kat iken, PERK genindeki kat değişimi değeri 39.27 ($p<0.05$) kat artış olarak gözlendi ( izelge 4.5). ATF6 ve GRP78 gen ekspresyon seviyelerinde ise hiçbir konsantrasyonda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$) (şekil 4.10).

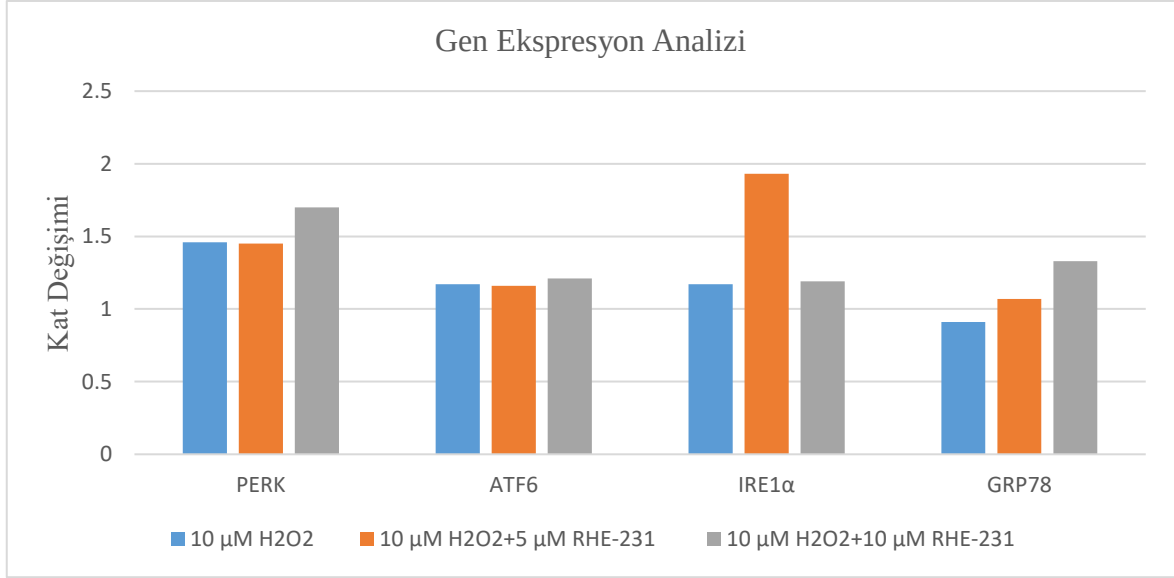
Çizelge 4.5. H_2O_2 (10 μM , 20 μM , 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde PERK, ATF6, IRE1 α ve GRP78 genlerine ait kat değişimi ve p değerleri

Gen sembolü	10 μM H_2O_2		10 μM H_2O_2 +5 μM RHE-231		10 μM H_2O_2 +10 μM RHE-231		20 μM H_2O_2		20 μM H_2O_2 +5 μM RHE-231		20 μM H_2O_2 +10 μM RHE-231	
	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri
PERK	1.46	0.960	1.45	0.949	1.70	0.659	1.96	0.264	3.65	0.032	39.27	0.012
ATF6	1.17	0.524	1.16	0.500	1.21	0.455	1.21	0.389	1.32	0.355	1.31	0.245
IRE1 α	1.17	0.135	1.93	0.270	1.19	0.405	1.50	0.388	11.95	0.026	14.31	0.00037
GRP78	0.91	0.738	1.07	0.671	1.33	0.259	0.16	0.389	1.21	0.416	1.01	0.975

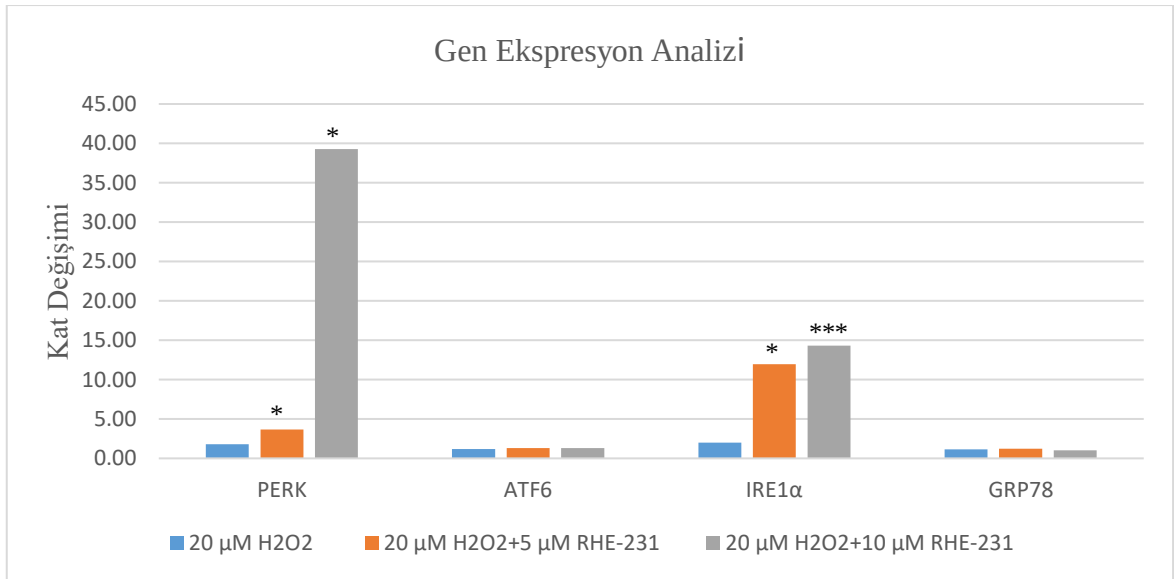


şekil 4.8. H_2O_2 (10 μM , 20 μM , 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231 (5 μM , 10 μM , 24 saat)'in PERK, ATF6, IRE1 α ve GRP78 gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi (* $p<0.05$ ve *** $p<0.001$). Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

PERK, ATF6, IRE1 α ve GRP78 gen ekspresyon seviyelerinde, 10 μ M H₂O₂, 10 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231 ve 10 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231 konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$) (Şekil 4.9).



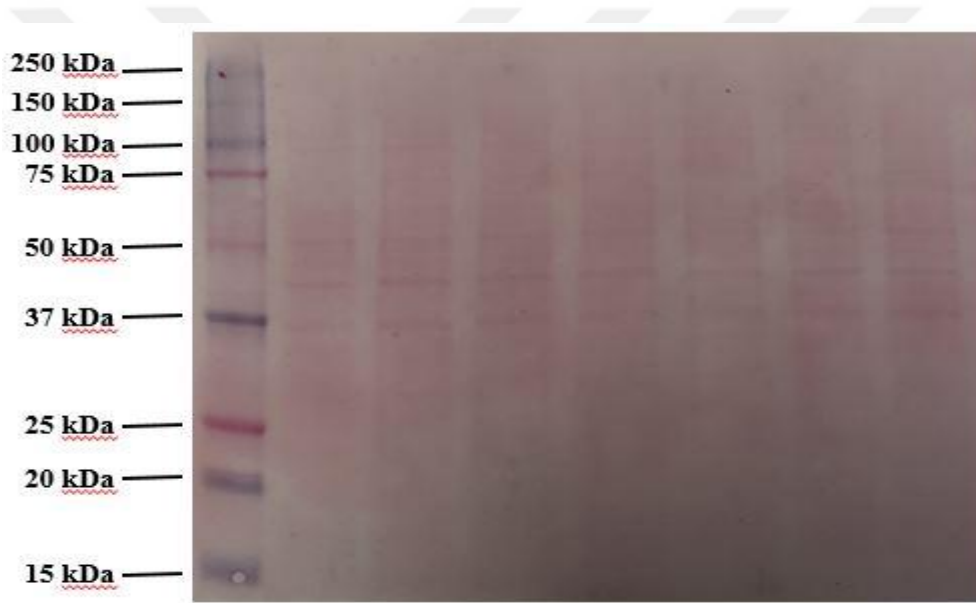
Şekil 4.9. H₂O₂ (10 μ M, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231 (5 μ M, 10 μ M, 24 saat)'in PERK, ATF6, IRE1 α ve GRP78 gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.



Şekil 4.10. H₂O₂ (20 μ M, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231 (5 μ M, 10 μ M, 24 saat)'in PERK, ATF6, IRE1 α ve GRP78 gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi (* $p<0.05$ ve *** $p<0.001$). Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

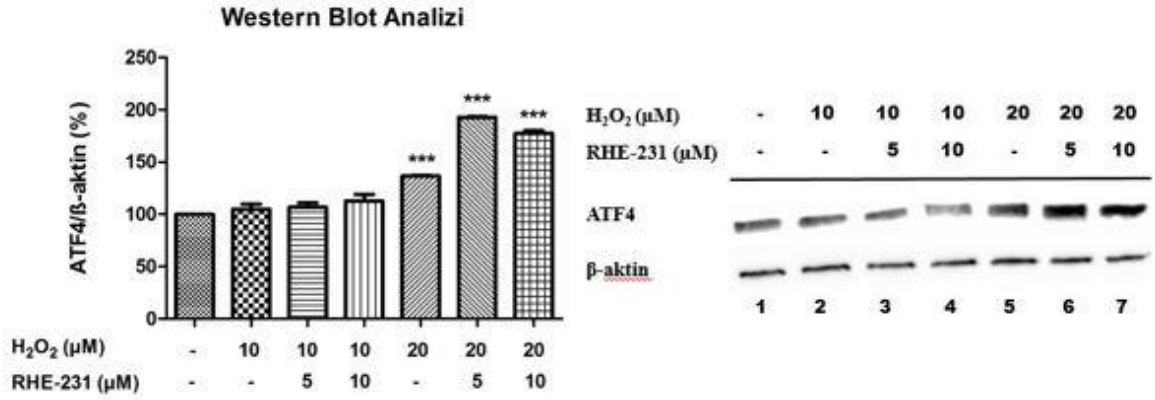
4.4. Western Blot Analizi

Yirmi dört saat süresince 10 μM H_2O_2 , 10 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231, 10 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231, 20 μM H_2O_2 , 20 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231 ve 20 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231'e maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinden elde edilen protein örnekleri kullanılarak ATF4 ve IRE1 α proteinlerinin Western Blot analizleri yapıldı. İnternal kontrol olarak β -aktin kullanıldı. Transfer etkinliğinin değerlendirilmesi için membran Ponceau S solüsyonu ile boyandı. Boyama neticesinde, ATF4 (39 kDa), IRE1 α (120 kDa) ve β -aktin (42 kDa) proteinlerinin bantları görüntülendi (Şekil 4.11).



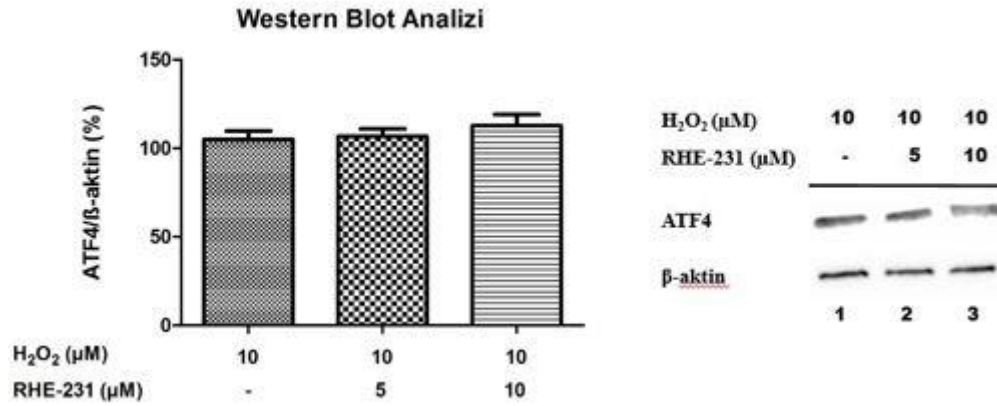
Şekil 4.11. Proteinlerin transfer edildiği membranın Ponceau S ile görüntülenmesi

Western blot analizi sonuçlarına göre, 24 saat inkübasyon süresi sonunda, ATF4 miktarında 20 μM H_2O_2 , 20 μM H_2O_2 + 5 μM RHE-231 ve 20 μM H_2O_2 + 10 μM RHE-231 konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0.001$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. H₂O₂ (24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in ATF4 proteini üzerine etkisi. 1- Kontrol grubu, 2- 10 μM H₂O₂, 3- 10 μM H₂O₂ + 5 μM RHE-231, 4- 10 μM H₂O₂ + 10 μM RHE-231, 5- 20 μM H₂O₂, 6- 20 μM H₂O₂ + 5 μM RHE-231 7- 20 μM H₂O₂ + 10 μM RHE-231 (***)*p*<0.001). Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

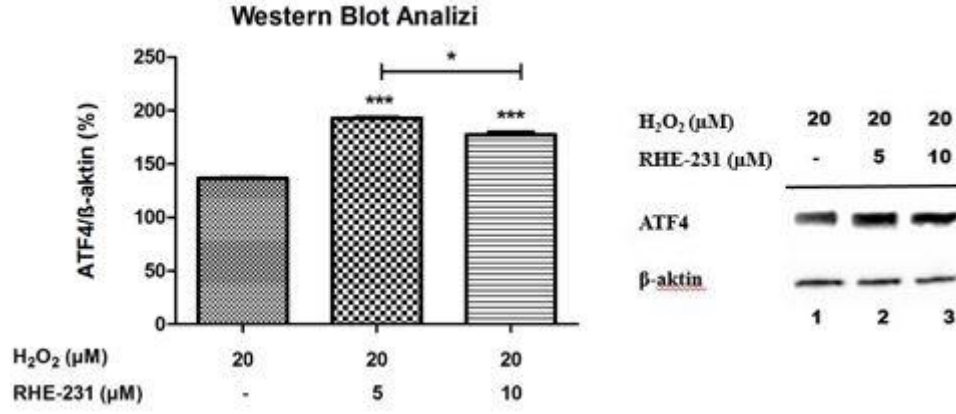
Western blot analizi sonuçlarına göre, 24 saat inkübasyon süresi sonunda, ATF4 miktarında 10 μM H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldığında, 10 μM H₂O₂ + 5 μM RHE-231 ve 10 μM H₂O₂ + 10 μM RHE-231 konsantrasyonlarında anlamlı bir fark gözlenmedi (*p*>0.05) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. H₂O₂ (10 μM, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in ATF4 proteini üzerine etkisi. 1- 10 μM H₂O₂, 2- 10 μM H₂O₂ + 5 μM RHE-231, 3- 10 μM H₂O₂ + 10 μM RHE-231. Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

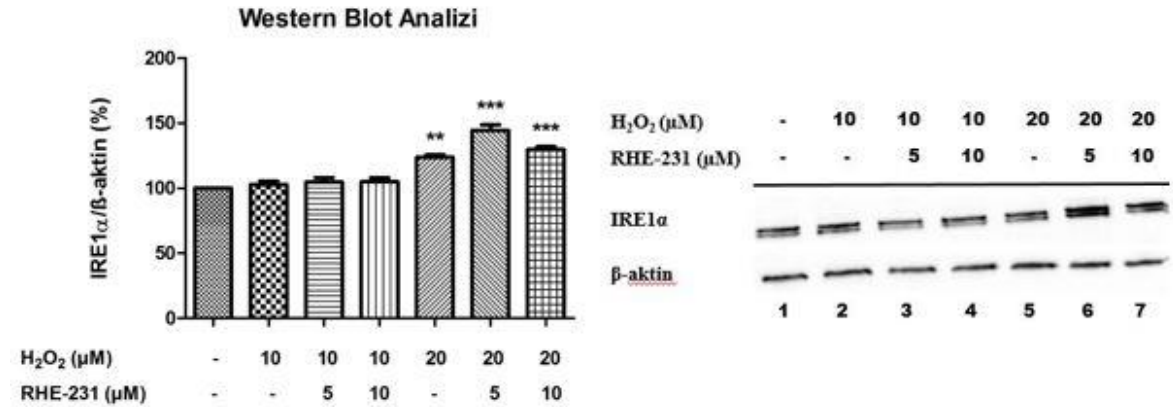
Western blot analizi sonuçlarına göre, 24 saat inkübasyon süresi sonunda, ATF4 miktarında 20 μM H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldığında, 20 μM H₂O₂ + 5 μM RHE-231 ve 20 μM H₂O₂ + 10 μM RHE-231 konsantrasyonlarında anlamlı bir fark gözlenmedi (*p*>0.05) (Şekil 4.14).

$\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + 10 $\mu\text{M RHE-231}$ konsantrasyonlarında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.05$ ve $p<0.001$) (Şekil 4.14).



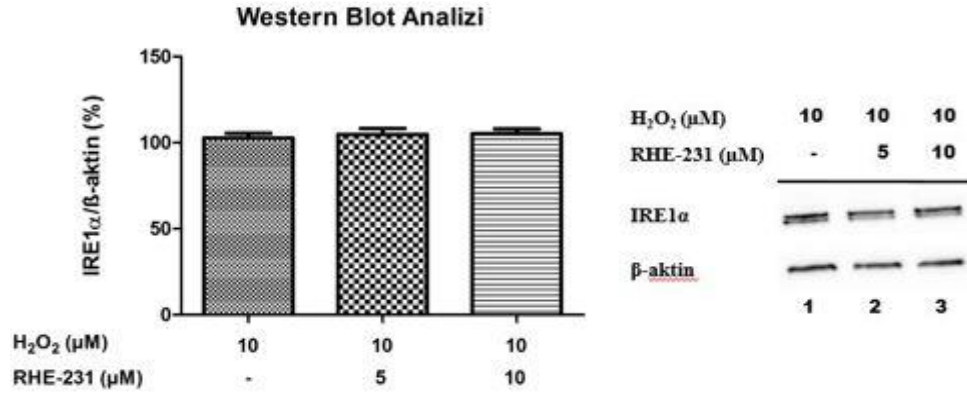
Şekil 4.14. H_2O_2 (20 μM , 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in ATF4 proteini üzerine etkisi. 1- 20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$, 2- 20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + 5 $\mu\text{M RHE-231}$, 3- 20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + 10 $\mu\text{M RHE-231}$ (* $p<0.05$ ve *** $p<0.001$). Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

Western blot analizi sonuçlarına göre, 24 saat inkübasyon süresi sonunda, IRE1 α miktarında 20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$, 20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + 5 $\mu\text{M RHE-231}$ ve 20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + 10 $\mu\text{M RHE-231}$ konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.01$ ve $p<0.001$) (Şekil 4.15).



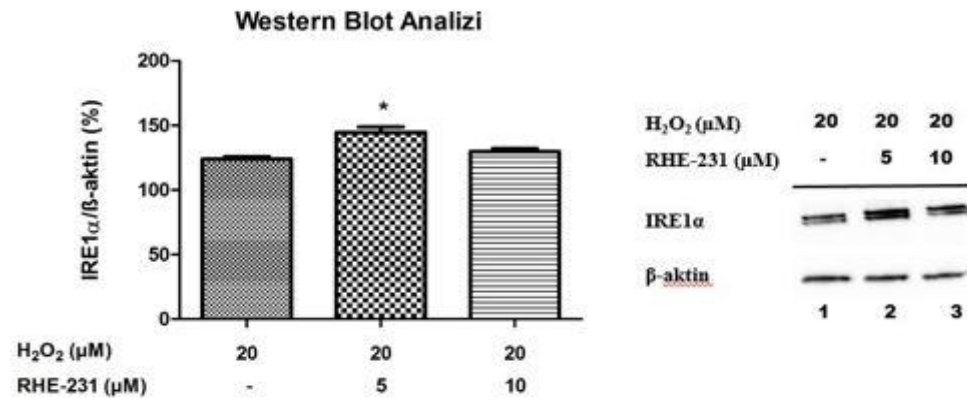
Şekil 4.15. H_2O_2 (24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in IRE1 α proteini üzerine etkisi. 1- Kontrol grubu, 2- 10 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$, 3- 10 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + 5 $\mu\text{M RHE-231}$, 4- 10 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + 10 $\mu\text{M RHE-231}$, 5- 20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$, 6- 20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + 5 $\mu\text{M RHE-231}$ 7- 20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ + 10 $\mu\text{M RHE-231}$ (** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$). Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

Western blot analizi sonuçlarına göre, 24 saat inkübasyon süresi sonunda, IRE1 α miktarında 10 μ M H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldığında, 10 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231 ve 10 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231 konsantrasyonlarında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. H₂O₂ (10 μ M, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in IRE1 α proteini üzerine etkisi. 1- 10 μ M H₂O₂, 2- 10 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231, 3- 10 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231. Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

Western blot analizi sonuçlarına göre, 24 saat inkübasyon süresi sonunda, IRE1 α miktarında 20 μ M H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldığında, 20 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231 konsantrasyonda anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. H₂O₂ (20 μ M, 24 saat) uyarılı BEAS-2B hücrelerinde RHE-231'in IRE1 α proteini üzerine etkisi. 1- 20 μ M H₂O₂, 2- 20 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231, 3- 20 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231 (* $p<0.05$). Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

5. TARTIŞMA

Solunum epiteli, dış çevre ile epitelin altında bulunan doku arasında fiziksel bir engel görevi görür. Aynı zamanda, solunum epiteli, normal akciğer fonksiyonunu korumak için çeşitli dinamik aktivitelere de sahiptir. Bu aktivitelerin başında, iyon transportu, yabancı maddelerin mukosilyer klirensi, solunum yüzeyinin korunması için yüzey aktif madde, mukus, antimikrobiyal peptitler gibi maddelerin salgılanması, solunum epitelinin onarımı, rejenerasyonu ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesi gelmektedir (Adkinson ve ark. 2013). Solunum epitelinin mikrobiyal saldırı, proteolitik hasar, ROS (Caramori ve ark. 2011, Wright ve ark. 1994) ve ER stresi (Malhotra ve ark. 2009, Korfei ve ark. 2008) gibi nedenlerden dolayı hasar görmesi, astım ve KOAH gibi inflamatuvar solunum yolu hastalıklarının başlamasında ve/veya hastalığın ilerlemesinde kilit bir rol oynamaktadır (Knight ve Holgate 2003).

İnsan bronş epitel hücre hattı olan BEAS-2B hücreleri, bronşial hastalıklarla ilgili *in vitro* çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Shi ve ark. 2010, Liu ve ark. 2012). Sigara dumanında bulunan bir oksidan olan H₂O₂'nin bronş epitel hücrelerinde oksidatif ve apoptotik hasara neden olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Xue ve ark. 2005, Kastner ve ark. 2011, Gao ve ark. 2012). Ancak, H₂O₂ ile indüklenen ROS'un BEAS-2B hücrelerinde ER stresinin ve UPR yolağının gen ve protein düzeyinde bir arada değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, oksidatif hasarlı hücre modeli oluşturularak, BEAS-2B hücrelerinde oksidatif stres koşulları altında, ER stresinin UPR'nin hangi yolağını tetiklediği ve yeni sentezlenen benzimidazol türevi bileşiğin (RHE-231) ER stresi ve UPR sinyal yolağında koruyucu bir etkisinin olup olmadığının aydınlatılması amaçlandı. Bu amaçla, çalışmanın ilk aşamasında, BEAS-2B hücreleri H₂O₂ ile muamele edildi. Çalışmada kullanılan en uygun konsantrasyonu seçebilmek için, bir sitotoksite testi olan MTT testi yapıldı. Bu test sonucunda, 24 saat süresince H₂O₂'ye maruz bırakılan hücrelerde 10 µM konsantrasyonda kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir fark gözlenmezken ($p>0.05$), 20, 30, 40, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$ ve $p<0.001$). Hidrojen peroksit

48 saat süresince maruz bırakılan hücrelerde ise, hücre canlılığında kontrol grubuna kıyasla hiçbir konsantrasyonda anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$).

Hidrojen peroksit tarafından indüklenen oksidatif stresin daha iyi değerlendirilebilmesi için, hücrelerde önemli bir toksisite etkisi yaratmayan H_2O_2 konsantrasyonu belirlendi (Lu ve ark. 2007). Bunun için, BEAS-2B hücrelerinde, H_2O_2 maruziyet süreleri sonunda elde edilen veriler doğrultusunda deneyler için maruziyet konsantrasyonları 10 ve 20 μM olarak, maruziyet süresi ise 24 saat olarak belirlendi.

Hidrojen peroksit, hücre ve doku kültürleri dahil olmak üzere, çoğu deneysel modelde oksidatif stres kaynaklı hücre hasarını incelemek için yaygın olarak kullanılan bir oksidandır. Hidrojen peroksit ayrıca canlı hücrelerde hücre metabolizmasının bir ürünü olarak oluşmakta olup, önemli bir sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır (Thannickal ve Fanburg 2000). Tsao ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, triterpenik asitlerin BEAS-2B ve 16HBE hücrelerinde koruyucu etkilerinin olup olmadığını araştırmışlardır. Bunun için hücreleri 100 μM H_2O_2 'ye maruz bırakmışlar ve her iki hücre hattında da hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığını ($p<0.05$) ve DNA fragmentasyonunun anlamlı bir şekilde arttığını göstermişlerdir. Jiang ve ark. (2014) ise, insan hepatoma hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, hücreleri 6 saat süresince farklı konsantrasyonlardaki (50, 100, 150, 200, 300, 500, 600, 800 ve 1000 μM) H_2O_2 ile muamele etmişlerdir. Oksidatif stres hasar modeli oluşturmak için hücre canlılığını MTT testi ile ölçmüşler ve 200 μM H_2O_2 konsantrasyonunda hücre canlılığının yaklaşık % 50 oranında azaldığını tespit etmişlerdir. Hidrojen peroksitin hücre içi konsantrasyonu, çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler tarafından kontrol edilmektedir (Gulden ve ark. 2010). Hidrojen peroksit katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından hızlı bir şekilde degrade edildiğinden yarı ömrü kısadır (Halliwell ve Gutteridge 1990, Farber 1994). Hidrojen peroksitin bu kararsızlığı nedeniyle, ekzojen olarak eklenen H_2O_2 'nin fizyolojik fonksiyonlarını ve toksik etkilerini, hücrelerin oksidatif stres yanıtlarını veya antioksidan ajanların sitoproteksiyonunu araştırmak için kullanılan deneysel modellerde, birbirinden farklı aralıkta maruziyet süresi ve konsantrasyonları bildirilmiştir (Masaki ve ark. 1998, Van der Vlies ve ark. 2002, Hirsch ve ark. 2014).

Oksidatif stres durumunda, lipid peroksidasyonu gerçekleşir. Reaktif oksijen türleri hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleri ile kolayca reaksiyona girer ve aldehitlerin üretimiyle kendiliğinden yayılan bir zincir reaksiyonunu başlatır. Bu da,

membran lipidlerinin yıkılmasına ve organizmanın zarar görmesine neden olur (Demling ve ark. 1995, La Maestra ve ark. 2015, Ozaras ve ark. 2000). Bu tez çalışmasında, H₂O₂'ye maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen oksidatif hasar, MDA seviyeleri ölçülerek değerlendirildi. 24 saat süresince 10 ve 20 µM konsantrasyonlarda H₂O₂'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücre lizatı örneklerinde MDA ölçümü yapıldı. Hem 10 µM hem de 20 µM maruziyet konsantrasyonlarında MDA düzeyi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). Wu ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, bir partikül madde olan PM_{2.5}'in BEAS-2B hücreleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Hücreleri PM_{2.5}'e 24 saat maruz bırakmışlar, bunun neticesinde oksidatif hasar göstergeleri olan ROS ve MDA miktarlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artış ($p<0.01$) olduğunu görmüşlerdir. Gurr ve ark. (2005) BEAS-2B hücrelerinde, oksidatif DNA hasarını ve lipid peroksidasyonunu titanyum dioksit (TiO₂)'nin kristal formları olan anataz ve rutil ile indüklemişlerdir. Titanyum dioksit maruz bırakılan hücrelerde MDA, nitrik oksit ve H₂O₂ miktarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını ($p<0.001$) göstermişlerdir. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH)'ın akciğerlerdeki yüksek oksidatif stres ile ilişkili olduğu (MacNee 2005, Kim ve ark. 2004) hatta oksidatif stresin KOAH gibi kronik hastalıkların altında yatan neden olarak gösterildiği belirtilmektedir (Heijink ve ark. 2013). Arpacı ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada, 100 KOAH olgusu olan hasta ve 100 kontrol olmak üzere toplam 200 örnekte MDA düzeylerini incelemişlerdir. Kontrol grubunda, ortalama MDA düzeyinin 6.88 ± 2.14 nmol/L aralığında olduğunu, KOAH olgusu olan grupta ise, ortalama MDA düzeyinin 12.88 ± 6.01 nmol/L aralığında olduğunu gözlemişlerdir. KOAH olgusu olan grupta ortalama MDA düzeyinin mevcut çalışmamızla uyumlu olarak, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığını ($p<0.01$) ortaya koymuşlardır.

Benzimidazol, benzen ve imidazol halkalarının kaynaşmasından oluşan bir yapıya sahiptir (Hofmann 1953). Benzimidazol halkası, biyolojik olarak önemli, aktif bir heterosiklik bileşik olarak bilinmektedir. Bu halka sisteminin çok sayıda farklı farmakolojik aktivitesi mevcuttur. Bunlar arasında, benzimidazol türevlerinin, antimikrobiyal (Eisa ve ark. 2010), antikanser (Styskala ve ark. 2008), antiviral (Hayes ve ark. 2008), antiparaziter (Gellis ve ark. 2008), antihipertansif (Shah ve ark. 2008), antiinflamatuvar (Gaba ve ark. 2010), antidiyabetik (Shingalapuri ve ark. 2010) ve antioksidan (Nakano ve ark. 1999) gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur.

Yeni sentezlenen benzimidazol türevi bileşik olan RHE-231'in H_2O_2 kaynaklı ER stresi ve UPR sinyal yolağında koruyucu bir etkisinin olup olmadığının aydınlatılması için, farklı konsantrasyonlarda (0-100 μM) RHE-231'in 24 saat süresince BEAS-2B hücre canlılığı üzerine olan etkisi değerlendirilerek maruziyet konsantrasyonları belirlendi. BEAS-2B hücrelerinin RHE-231'e 24 saat maruz bırakılması neticesinde 5 μM konsantrasyonda kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir fark gözlenmezken ($p>0.05$), 10, 25, 50, 75 ve 100 μM konsantrasyonlarda hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$ ve $p<0.001$). Daha sonra, maruziyet süreleri sonunda elde edilen veriler doğrultusunda % canlılık değerleri hesaplandı. Elde edilen veriler değerlendirilerek deneyler için 5 ve 10 μM maruziyet konsantrasyonları olarak belirlendi. Apohan ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, 14 yeni benzimidazol türevi bileşik sentez etmişlerdir. Yeni sentezlenen bileşiklerin sitotoksik aktivitelerini A549 ve BEAS-2B hücrelerinde incelemişlerdir. İncelenen bileşiklerden üçünün (bileşik 1, 4 ve 5) yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Apohan ve ark. 2017).

Can Eke ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada, bir seri yeni benzimidazol türevi bileşik sentezlemişler ve bu bileşiklerin antioksidan özelliklerinin olup olmadığını *in vitro* ortamda sıçan mikrozomlarında lipid peroksidasyonu düzeylerine bakarak tespit etmişlerdir. Yeni sentez ettikleri bileşiklerden birinin lipid peroksidasyonunu sıçan karaciğerinde 10^{-4} M konsantrasyonda % 20, 10^{-3} M konsantrasyonda ise % 40 inhibe ettiğini, ancak aynı bileşiğin akciğer ve böbreklerde lipid peroksidasyonunu inhibe edici özelliğinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Gurer-Orhan ve ark. (2006) bir seri melatonin analogu yeni benzimidazol türevi bileşiği *in vitro* ortamda H_2O_2 ile indüklemişler ve eritrosit membran lipid peroksidasyonu (EMLP) sisteminde antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Yeni sentezlenen bu benzimidazol türevi bileşiğin 0,5 mM konsantrasyonda EMLP'yi en yüksek değerle inhibe ettiğini ve bu bulgunun benzimidazol halkasına bağlı apolar yan zincirin eritrosit membranında yer alan apolar fosfolipit vb. bileşenler ile etkileşimiyle açıklanabileceğini bildirmişlerdir. Tiyosemikarbazit, tiyadiazoilmetilbenzimidazol ve triazoilmetilbenzimidazol yapısında bir seri yeni bileşik sentezleyen Kerimov ve ark. (2007) ise, bu 3 bileşiğin antioksidan özelliklerini, NADPH'a bağlı lipid peroksidasyon düzeylerini araştırmışlardır. Tiyosemikarbazit taşıyan benzimidazol türevi bileşiğin % 80-100 aralığında lipid peroksidasyonunu inhibe edici etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Oksidatif stres ER’de protein katlanmasının bozulmasına neden olur (Kelsen ve ark. 2008). Hatalı katlanmış proteinler ER katlama kapasitesini aştığında, ER katlama yükünde dengesizlik meydana gelir. Bu durum, ER stresini indükleyerek UPR’yi aktive eder (Ron ve Walter 2007, Schröder ve Kaufman 2005b, Dufey ve ark. 2014, Brewer 2014, Walter ve Ron 2011). UPR’nin üç kolu (PERK, IRE1 ve ATF6), yeni polipeptitlerin ER’ye akışını yavaşlatarak ER stresini tersine çeviren bir dizi transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel süreçleri içerir. ER stresi tersine çevrilemediğinde ise, UPR hücre apoptozunu indükler. Gao ve ark. (2012) H₂O₂’nin GRP78’i ve protein ubiquitinasyonunu düzenleyerek UPR’yi tetikleyebileceğini ve bunun da renal tübüler epitel hasarına katkıda bulunabileceğini göstermişlerdir. Oksidatif stres, çeşitli akciğer proteinlerine geri dönüşümsüz olarak zarar verir ve bu proteinler ubiquitin-proteazom sistemi veya otofajik vakuoller vasıtasıyla degrade edilir (Kenche ve ark. 2013, Van Rijt ve ark. 2012, Groskreutz ve ark. 2010).

Bu tez çalışmasında, ROS oluşumu indüklenen BEAS-2B hücrelerinde, maruziyet ve kontrol grupları, UPR parametreleri olan IRE1 α , GRP78, PERK ve ATF6 genlerinin ekspresyon düzeyleri, ATF4 ve IRE1 α ’nın ise protein ekspresyon düzeyleri açısından kıyaslandı. Böylelikle, BEAS-2B hücrelerinde oksidatif stres koşulları altında ortaya çıkan ER stresi ve UPR yolağının aktif olmasının altında yatan sebebin yukarıda belirtilen gen ve proteinlerle ilişkili olup olmadığı ve RHE-231’in oluşan bu ER stresini hafifletip hafifletmediği değerlendirildi.

Mevcut çalışmamızda, UPR yolağında yer alan parametrelerden IRE1 α ve PERK gen ekspresyon seviyelerinin, maruziyet grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. 20 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231 ve 20 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231 konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış bulundu. 20 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231 konsantrasyonda IRE1 α genindeki kat değişimi değeri 11.95 ($p<0.05$) kat iken, PERK genindeki kat değişimi değeri 3.65 ($p<0.05$) kat; 20 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231 konsantrasyonda IRE1 α genindeki kat değişimi değeri 14.31 ($p<0.001$) kat iken, PERK genindeki kat değişimi değeri 39.27 ($p<0.05$) kat artış olarak gözlemlendi. UPR yolağında yer alan diğer parametrelerden ATF6 ve GRP78 gen ekspresyon seviyelerinde ise, gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Çalışmamızdan farklı olarak, Xue ve ark. (2005), mürin fibrosarkom hücrelerini kullanarak TNF α ’nın ROS’a bağlı bir şekilde UPR’yi

indüklediğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda, H₂O₂ indüklü oksidatif stresin sadece eIF2 α yolağını aktif ettiğini, ancak IRE1 yolağını aktif etmediğini ortaya koymuşlardır.

UPR yolağında yer alan parametrelerden ATF6 ve GRP78'te bir farkın görülmemesi ($p>0.05$), PERK ve IRE1 α 'da ise artış görülmesi ($p<0.05$ ve $p<0.001$) oksidatif stres uyarılı BEAS-2B hücrelerinde ER stresinin PERK ve IRE1 α yolağı üzerinden tetiklendiğini düşündürmektedir. Ancak gen ekspresyonu düzeyinde elde edilen sonuçlar ilgili değerlendirmeler için yetersiz kalmaktadır. Bu sonucu desteklemek için, mevcut sonuçların protein düzeyi ile desteklenmesi gerekmektedir. Nitekim çalışmamızda bu değerlendirme aşamasında ilgili parametrelerin protein düzeyi Western Blot ile tayin edildi. Protein seviyelerinde 20 μ M H₂O₂, 20 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231 ve 20 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231 konsantrasyonlarında ATF4 ve IRE1 α miktarlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artış gözlemlendi ($p<0.001$). Zhang ve Wang (2018) tauroursodeoksikolik asit (TUDCA)'nın ER stresini hafifletip hafifletmediğini test etmek için, yenidoğan sıçan kardiyomiyositlerini 6 saat boyunca farklı H₂O₂ konsantrasyonlarına (0.1-2 mM) maruz bırakmışlardır. Bizim çalışmamızdan farklı olarak, maruziyet sonrasında H₂O₂'nin GRP78 ekspresyon düzeyini kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artırdığını ($p<0.05$) fakat daha sonra H₂O₂'nin bu etkilerinin TUDCA ile azaldığını ortaya koymuşlardır.

İnositol gerektiren enzim 1 α (IRE1 α), bir transmembran ER stres sensörüdür (Patil ve Walter 2001, Kaufman ve ark. 2002). IRE1 α 'nın aktif olmasıyla XBP1 splay edilir. Splay edilmiş XBP1 (XBP1s) mRNA'sı, protein katlanmasında görev alan ER şaperonlarının, foldazların, çeşitli sitokinleri kodlayan genlerin ve ERAD ilişkili genlerin (Ruggiano ve ark. 2014) ekspresyon seviyesini artıran transkripsiyon faktörü olarak görev yapar (Yoshida ve ark. 2001, Calton ve ark. 2002, Lee 2001, Urano ve ark. 2000). XBP1s ayrıca kolesterol sentezinde rol oynayan genleri ve ER membranının genişlemesine izin veren yeni lipid çift katmanlarının oluşumunu artırır (Lee ve ark. 2003). Çalışmamızda IRE1 α gen ekspresyon düzeyinin H₂O₂ konsantrasyonu artışına bağlı olarak artmasının nedeni, UPR'nin aktif olmasıyla birlikte IRE1 α 'nın ER şaperon miktarının, ERAD genlerinin ve ER membran lipidlerinin biyosentezini artırmak için olabileceğini düşündürmektedir. IRE1 α gen ekspresyon düzeyinin 20 μ M H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldığında 20 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231 konsantrasyonda 11.95 ($p<0.05$) kat, 20 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231 konsantrasyonda ise 14.31 ($p<0.05$) kat artış göstermesi, RHE-231'in ER stresini hafifletmek adına herhangi bir olumlu etki göstermediğini, bu nedenle IRE1 α gen ekspresyon düzeyinde azalmanın

olmadığını düşündürmektedir. Nitekim IRE1 α 'nın protein sonuçları da gen ekspresyon sonucunu desteklemektedir. Lin ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, HEK293 hücrelerinde UPR yolağındaki PERK, IRE1 ve ATF6'yı incelemişler ve stres devam etse bile, üç sinyalin zayıflatılmasının zaman sürecinin birbirinden farklı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar uzun süreli ER stresi sırasında, önce IRE1 sinyalinin, ardından ATF6'nın ve son olarak da PERK sinyalinin kapatıldığını göstermişlerdir. Daha sonra IRE1 sinyalini deneysel olarak uzatmışlar ve hücre sağkalımının arttığını gözlemişlerdir. Böylece IRE1 aktivitesi ile hücre sağkalımı arasında bir bağlantı olduğunu göstermişlerdir. Sonuçta, stres devam etse bile IRE1 sinyalinin zayıflamasının, UPR indüksiyonundan sonra hücrenin hayatta kalma veya ölüm kararını vermede önemli bir adım olacağını ortaya koymuşlardır. Ge ve ark. (2018) sıçanlarda spinal sinir ligasyon (SNL) modeli oluşturarak ER stresi ve nöropatik ağrı arasındaki neden-sonuç ilişkisini incelemişlerdir. SNL modelinin sıçanların omuriliğinde oksidatif stres meydana getirdiğini ($p>0.05$) ve buna bağlı olarak da ER stres markırlarından IRE1, PERK ve ATF6'nın aktivasyonunda önemli artış olduğunu ortaya koymuşlardır. Daha sonra, SNL sıçanlarının nosiseptif davranışı üzerindeki etkisini incelemek için sıçanlara TUDCA vermişlerdir. TUDCA ile muamele sonrasında, SNL tarafından indüklenen ER stres markırlarının (IRE1, PERK ve ATF6) ifadelerinin büyük ölçüde azaldığını gözlemişlerdir.

Protein kinaz-benzeri ER kinaz (PERK) yolağı, çeşitli lösün fermuar transkripsiyon faktörleri, Nrf2 ve bir transkripsiyon faktörü olan ATF4'ün ekspresyonunu artırarak oksidatif strese karşı hücrel yanıtta önemli rol oynar (Harding ve ark. 2003, Schröder ve Kaufman 2005b, Koritzinsky ve ark. 2006, Cullinan ve Diehl 2004). Çalışmamızda PERK gen ekspresyon düzeyinin H₂O₂ konsantrasyonu artışına bağlı olarak artmasının nedeni, UPR'nin aktif olmasıyla birlikte H₂O₂'nin meydana getirdiği oksidatif hasarı hafifletmek için olabileceğini düşündürmektedir. PERK gen ekspresyon düzeyinin 20 μ M H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldığında 20 μ M H₂O₂ + 5 μ M RHE-231 konsantrasyonda 3.65 ($p<0.05$) kat, 20 μ M H₂O₂ + 10 μ M RHE-231 konsantrasyonda ise 39.27 ($p<0.001$) kat artış göstermesi, RHE-231'in ER stresini hafifletmek adına herhangi bir olumlu etki göstermediğini, bu nedenle PERK gen ekspresyon düzeyinde azalmanın olmadığını düşündürmektedir. Nitekim PERK'in aktive ettiği ATF4'ün protein sonuçları da PERK gen ekspresyon sonucunu desteklemektedir. Jung ve ark. (2007) BEAS-2B hücrelerini pro-oksidatif bir madde olan dizel egzoz partikülü (DEP) ile muamele etmişlerdir. Daha sonra hücreleri bir antioksidan olan N-asetilsistein (NAC) varlığında veya yokluğunda muamele etmişlerdir. DEP ile

maruziyet sonrasında, çalışmamızla uyumlu olarak, konsantrasyon ve zamana bağlı bir şekilde ATF4 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. NAC ile muamele edildiğinde ise ATF4'ün ekspresyonunun düştüğünü ortaya koymuşlardır. Yu ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, BEAS-2B hücrelerinde GRP78, p-eIF2a ve CHOP ekspresyon seviyelerini ölçerek sigara dumanı ekstraktının ER stresini tetikleyip tetiklemediğini araştırmışlardır. Sigara dumanı ekstraktına maruz bırakılan hücrelerde GRP78, p-eIF2a ve CHOP miktarlarının zamana bağlı bir şekilde önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir. Daha sonra 14,15-epoksieikosatrienoik asit (14,15-EET)'nin sigara dumanı ekstraktı kaynaklı ER stresini üzerindeki etkisini araştırmışlardır. 14,15-EET ile maruziyet sonrasında, sigara dumanı ekstraktı ile indüklenen GRP78, p-eIF2 α ve CHOP ekspresyon düzeyinin önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuşlardır.

Katlanmamış protein cevabı aktive edildiğinde, IRE1 ve PERK'in sitozolik domainleri otofosforilasyona uğramaktadır (Kawaguchi ve Ng 2011, Gardner ve ark. 2013). IRE1 ve PERK'in aktivasyonu birkaç bZIP transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu artırır. PERK ile indüklenen eIF2 α , ATF4'ü kodlayan mRNA'nın translasyonunu kolaylaştırır. Bu da apoptozda rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan CHOP'un ekspresyonunu artırır (Hetz 2012, Lee ve ark. 2003). Bununla birlikte, yanlış katlanmış proteinlerin nasıl algılandığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. GRP78'in yanlış katlanmış proteinlerin birikimine yanıt olarak PERK, IRE1 ve ATF6'nın lümen yüzeyindeki bağlanma bölgelerinden ayrıldığına inanılmaktadır. Bunun yanında, IRE1 ve PERK'in lümen yüzeyindeki peptit oluklarına yanlış katlanmış proteinlerin doğrudan bağlanmasının da aktive edici olduğu belirtilmektedir. ATF6'da böyle bir bağlayıcı oluk bulunmamaktadır (Kawaguchi ve Ng 2011, Gardner ve ark. 2013). Ayrıca, UPR'nin birkaç kolu işbirliği içinde etkileşime girer ve bir yolağın aktivitesini artırabilir. Örneğin, ATF6, XBP1s'in ekspresyonunu artırır ve bununla dimerize olur. ATF6 ayrıca CHOP ekspresyonunu artırmak için ATF4 ile etkileşime girer (Walter ve Ron 2011).

Kelsen ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, kronik olarak sigara içmenin insan akciğerinde UPR'yi indüklediği hipotezini test etmek için karşılaştırmalı proteomik analizi yapmışlardır. Bunun için, sigara içmeyenler, kronik sigara içenler ve daha önceden sigara içenler olmak üzere üç gruptan elde edilen akciğer dokusu örnekleri üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Sigara içmeyenlere kıyasla, kronik sigara içenlerde ve daha önceden sigara içenlerde GRP78, kalretikulin, protein disülfid izomeraz (PDI) ve antioksidan savunmasında

yer alan enzimler gibi belirli UPR proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığını ortaya koymuşlardır. Daha sonra, *in vitro* ortamda, insan solunum epitel hücrelerini sigara dumanı ekstraktı ile muamele etmişler ve ATF4, Nrf2 ve GRP78'in hızlı bir şekilde (<24 saat) arttığını bildirmişlerdir. Bu veriler ile sigara dumanının insan akciğerinde başlangıçta hızlı, konsantrasyona bağlı ve sigarayı bırakma ile geri dönüşümlü olarak UPR'yi aktif hale getirdiğini göstermişlerdir.

Kenche ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, *in vivo* olarak sigara dumanına maruz bırakılan farelerde p-eIF2 α , CHOP ve p50 ATF6N proteinlerinin ekspresyonunun arttığını ve tek bir sigaraya akut olarak maruz bırakıldıktan sonra bile fare akciğer lizatlarında XBP1s mRNA'sında küçük (iki kattan az) değişiklik olduğunu göstermişlerdir. Değişikliklerin maruziyetten 12 saat sonra azaldığını bildirmişlerdir. Geraghty ve ark. (2011) ise yaptıkları çalışmada, fareleri 4 hafta sigara dumanı ekstraktına maruz bırakmışlar ve fare akciğer lizatlarında ATF4 ve CHOP mRNA'sının arttığını göstermişlerdir. Bir yıl süresince uygulanan maruziyetten sonra ise, kontrol değerlerinin altında önemli düşüşler olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra araştırmacılar 10 gün boyunca sigara dumanı ekstraktına maruz bırakılan farelerin alveolar makrofajlarında ATF4 ve CHOP mRNA'sının arttığını bildirmişlerdir. Farelerdeki bu iki çalışmanın sonuçları, UPR'deki değişikliklerin hızlı, geçici ve hücre tipine bağlı olma ihtimalini ortaya koymaktadır (Geraghty ve ark. 2011).

Yukarıda yapılan çalışmaların aksine, Korfei ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, son evre KOAH hastalarının eksplante edilen akciğerlerinde UPR belirteçleri olan GRP78, XBP1s, CHOP ve ATF6N'nin ekspresyonunu saptamamışlardır. Bununla birlikte, bu UPR belirteçlerinin, idiyopatik pulmoner fibrozis (İPF)'li deneklerin akciğerlerinde ve bu deneklerden izole edilen alveolar tip II epitel hücrelerinde arttığını göstermişlerdir (Korfei ve ark. 2008).

Solunum epiteli vücudun iç çevresi ile dış çevre arasında bir ara yüz olarak işlev görerek solunum yolunun yabancı partiküllerden korunmasında büyük öneme sahiptir. Oksidatif ajanlara maruz bırakılan epitel dokusunun ER stresine neden olduğunu gösteren birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma mevcuttur. Bu tez çalışmasında, insan bronş epitel hücre hattı olan BEAS-2B hücreleri H₂O₂'ye maruz bırakılarak oksidatif hasarlı hücre modeli oluşturulmuştur. Maruziyet sonrasında, BEAS-2B hücrelerinde hücre canlılığının azaldığı, ER stresinin arttığı ve UPR yolağında yer alan IRE1 α ve PERK gen ekspresyon düzeylerinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular H₂O₂ gibi oksidan maddelerin

başta KOAH olmak üzere, kronik solunum yolu hastalıklarının gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bunun yanında, ER stresini hafifletmesini beklediğimiz benzimidazol türevi bileşik olan RHE-231'in ilgilenilen yolak üzerinde etkili olmadığı ortaya koyulmuştur. H₂O₂'nin BEAS-2B hücrelerinde gösterilen etkilerinin altında yatan mekanizmaların daha iyi aydınlatılması için, çalışmamızdan elde edilen *in vitro* verilerin hayvan modelleri oluşturularak *in vivo* ortamda da test edilmesi verilerimizin geçerliliğinin test edilmesi açısından yararlı olacağı düşünülmektedir.



6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, BEAS-2B hücrelerinde, konsantrasyona bağlı olarak, oksidatif stresin gen ve protein düzeyinde ER stresini uyardığını ve UPR yolağını aktif hale getirdiğini gözlemledik. Ancak, farklı biyolojik aktivitelere sahip olan ve UPR yolağındaki etkisini araştırdığımız yeni sentezlenen benzimidazol türevi bileşik RHE-231'in ER stresini hafifletmede etkili olmadığını gözlemledik. Birçok hastalığın patofizyolojisinde rol alan ER stresini azaltacak potansiyel moleküllerin keşfi için daha fazla yeni molekülün sentezlenip biyolojik aktivitelerinin araştırılması gerekmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. **Adkinson Jr, NF, Bochner BS, Burks AW, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, O'Hehir RE.** *Middleton's Allergy e-Book: Principles and Practice*. 8th ed., Elsevier Health Sciences, USA, **2013**, s. 639
2. **Albelda SM, Buck CA.** Integrins and other cell adhesion molecules. *The FASEB Journal*, **1990**, 4(11): 2868-2880
3. **Al-Qenaei A, Yiakouvaki A, Reelfs O, Santambrogio P, Levi S, Hall ND, Pourzand C.** Role of intracellular labile iron, ferritin, and antioxidant defence in resistance of chronically adapted Jurkat T cells to hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, **2014**, 68: 87-100
4. **Apohan E, Yilmaz U, Yilmaz O, Serindag A, Küçükbay H, Yesilada O, Baran Y.** Synthesis, cytotoxic and antimicrobial activities of novel cobalt and zinc complexes of benzimidazole derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry*, **2017**, 828: 52-58
5. **Arcavi L, Benowitz NL.** Cigarette smoking and infection. *Archives of Internal Medicine*, **2004**, 164(20): 2206-2216
6. **Arja C, Surapaneni KM, Raya P, Adimoolam C, Balisetty B, Kanala KR.** Oxidative stress and antioxidant enzyme activity in South Indian male smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*, **2013**, 18(7): 1069-1075
7. **Arpaci A, Yalin S, Taskin D, Fakioglu F, Ulutas KT, Comelekoglu U.** Investigation of antioxidant enzyme polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Biomedical Research*, **2018**, 29(9): 1906-1913
8. **Balch WE, Sznajder JI, Budinger S, Finley D, Laposky AD, Cuervo AM, Weissman AM.** Malfolded protein structure and proteostasis in lung diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2014**, 189(1): 96-103
9. **Baranowsky A, Mokkapati S, Bechtel M, Krügel J, Miosge N, Wickenhauser C, Nischt R.** Impaired wound healing in mice lacking the basement membrane protein nidogen 1. *Matrix Biology*, **2010**, 29(1): 15-21
10. **Barker HA, Smyth RD, Weissbach H, Toohey JI, Ladd JN, Volcani BE.** Isolation and properties of crystalline cobamide coenzymes containing Benzimidazole or 5,6- Dimethylbenzimidazole. *Journal of Biological Chemistry*, **1960**, 235(2): 480-488
11. **Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA.** Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal*, **2003**, 22(4): 672-688
12. **Barnes PJ.** Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology*, **2008**, 8(3): 183-192
13. **Barnes PJ.** Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacological Reviews*, **2004**, 56(4): 515-548
14. **Baum B, Georgiou M.** Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *The Journal of Cell Biology*, **2011**, 192(6): 907-917
15. **Berndt A, Leme AS, Shapiro SD.** Emerging genetics of COPD. *EMBO Molecular Medicine*, **2012**, 4(11): 1144-1155
16. **Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP.** Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **2006**, 1758(8): 994-1003
17. **Blanc D, Iribarren C, Trupin L, Earnest G, Katz PP, Balmes J, Eisner MD.** Occupational exposures and the risk of COPD: dusty trades revisited. *Thorax*, **2009**, 64(1): 6-12
18. **Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB.** Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **1998**, 157(6): 2000-2006
19. **Bonvallot V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, Marano F.** Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **2001**, 25(4): 515-521
20. **Boyce M, Yuan J.** Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death and Differentiation*, **2006**, 13(3): 363-373 **Brewer JW.** Regulatory crosstalk within the mammalian unfolded protein response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2014**, 71(6): 1067-1079

21. **Buettner GR.** Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, **2011**, 11(4): 341-346
22. **Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Jensen RL.** International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *The Lancet*, **2007**, 370(9589): 741-750
23. **Button B, Cai LH, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, Rubinstein M.** A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science*, **2012**, 337(6097): 937-941
24. **Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Ron D.** IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, **2002**, 415(6867): 92-96
25. **Calikoglu M, Unlu A, Tamer L, Ercan B, Bugdayci R, Atik U.** The levels of serum vitamin C, malonyldialdehyde and erythrocyte reduced glutathione in chronic obstructive pulmonary disease and in healthy smokers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **2002**, 40(10): 1028-1031
26. **Can-Eke B, Puskullu MO, Buyukbingol E, Iscan M.** A study on the antioxidant capacities of some benzimidazoles in rat tissues. *Chemico-Biological Interactions*, **1998**, 113(1): 65-77
27. **Caramori G, Adcock IM, Casolari P, Ito K, Jazrawi E, Tsaprouni L, Barnes PJ.** Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer. *Thorax*, **2011**, 66(6): 521-527
28. **Cardoso WV, Whitsett JA.** Resident cellular components of the lung: developmental aspects. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **2008**, 5(7): 767-771
29. **Chou CK, Liu W, Hong YJ, Dahms HU, Chiu CH, Chang WT, Chiu CC.** Ethyl acetate extract of *Scindapsus cf. hederaceus* exerts the inhibitory bioactivity on human non-small cell lung cancer cells through modulating ER stress. *International Journal of Molecular Sciences*, **2018**, 19(7): 1832
30. **Churg A, Cosio M, Wright JL.** Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **2008**, 294(4): L612-L631
31. **Cullinan SB, Diehl JA.** PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279(19): 20108-20117
32. **Dacydchenko SV, Bova AA.** The role of respiratory infection in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Klinicheskaia Meditsina*, **2007**, 85(5): 10-15
33. **Daniela FA, Maria LLL, Bernard IAS, Andrea GSA, Lizeth LEC, Luis RPJ.** Intracellular redox status and cell death induced by H₂O₂ in a human retinal epithelial cell line (Arpe-19). *American Journal of BioScience*, **2015**, 3(3): 93-113
34. **Davenport EL, Morgan GJ, Davies FE.** Untangling the unfolded protein response. *Cell Cycle*, **2008**, 7(7): 865-869
35. **Decramer M, Janssens W, Miravittles M.** Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, **2012**, 379(9823): 1341-1351
36. **Demling R, Ikegami K, Lalonde C.** Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant activity correspond with death after smoke exposure in the rat. *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, **1995**, 16(2): 104-110
37. **Demoly P, Simony-Lafontaine J, Chanez P, Pujol JL, Lequeux N, Michel FB, Bousquet J.** Cell proliferation in the bronchial mucosa of asthmatics and chronic bronchitics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **1994**, 150(1): 214-217
38. **Dufey E, Sepulveda D, Rojas-Rivera D, Hetz C.** Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **2014**, 307(7): C582-C594
39. **Dunsmore SE, Rannels DE.** Extracellular matrix biology in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **1996**, 270(1): L3-L27
40. **Eisa HM, Barghash AEM, Badr SM, Farahat AA.** Synthesis and antimicrobial activity of certain benzimidazole and fused benzimidazole derivatives. *Indian Journal of Chemistry*, **2010**, 49B: 1515-1525
41. **Empey DW.** Diseases of the respiratory system. Introduction: structure and function of the lungs. *British Medical Journal*, **1978**, 1(6113): 631-633
42. **Eno CO, Zhao G, Venkatanarayan A, Wang B, Flores ER, Li C.** Noxa couples lysosomal membrane permeabilization and apoptosis during oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, **2013**, 65, 26-37

43. **Evans CM, Williams OW, Tuvim MJ, Nigam R, Mixides GP, Blackburn MR, Stripp BR.** Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **2004**, 31(4): 382-394
44. **Evans MJ, Cox RA, Shami SG, Plopper CG.** Junctional adhesion mechanisms in airway basal cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **1990**, 3(4): 341-347
45. **Even-Tzur N, Kloog Y, Wolf M, Elad D.** Mucus secretion and cytoskeletal modifications in cultured nasal epithelial cells exposed to wall shear stresses. *Biophysical Journal*, **2008**, 95(6): 2998-3008
46. **Farber JL.** Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environmental Health Perspectives*, **1994**, 102(1994): 17-24
47. **Farmer SG, Hay Douglas WP.** The airway epithelium: Physiology, pathophysiology and pharmacology. eds. New York: Marcel Dekker, **1991**, ss. 680
48. **Feltens R, Mogel I, Roder-Stolinski C, Simon JC, Herberth G, Lehmann I.** Chlorobenzene induces oxidative stress in human lung epithelial cells *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2010**, 242(1): 100-108
49. **Finkel T, Holbrook NJ.** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **2000**, 408(6809): 239-247
50. **Fleming TP.** Epithelial organization and development. *Springer Science & Business Media*, **2012**.
51. **Forteza RM, Casalino-Matsuda SM, Falcon NS, Gattas MV, Monzon ME.** Hyaluronan and layilin mediate loss of airway epithelial barrier function induced by cigarette smoke by decreasing E-cadherin. *Journal of Biological Chemistry*, **2012**, 287(50): 42288-42298
52. **Fribley A, Zhang K, Kaufman RJ.** Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Apoptosis*, **2009**, 559: 191-204
53. **Gaba M, Singh D, Singh S, Sharma V, Gaba P.** Synthesis and pharmacological evaluation of novel 5-substituted-1-(phenylsulfonyl)-2-methylbenzimidazole derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 45(6): 2245-2249
54. **Gao X, Fu L, Xiao M, Xu C, Sun L, Zhang T, Mei C.** The nephroprotective effect of tauroursodeoxycholic acid on ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **2012**, 111(1): 14-23
55. **Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P.** Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2013**, 5(3): a013169
56. **Ge Y, Jiao Y, Li P, Xiang Z, Wang L, Li W, Yu W.** Coregulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in neuropathic pain and disinhibition of the spinal nociceptive circuitry. *Pain*, **2018**, 159(5): 894-906
57. **Gellis A, Kovacic H, Boufatah N, Vanelle P.** Synthesis and cytotoxicity evaluation of some benzimidazole-4, 7-diones as bioreductive anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 43(9): 1858-1864
58. **Genestra M.** Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*, **2007**, 19(9): 1807-1819
59. **Geraghty P, Wallace A, D'Armiento JM.** Induction of the unfolded protein response by cigarette smoke is primarily an activating transcription factor 4-C/EBP homologous protein mediated process. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, **2011**, 6: 309-319
60. **Gething MJ.** Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **1999**, 10(5): 465-472
61. **Ghosh MC, Gorantla V, Makena PS, Luellen C, Sinclair SE, Schwingshackl A, Waters CM.** Insulin-like growth factor-I stimulates differentiation of ATII cells to ATI-like cells through activation of Wnt5a. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **2013**, 305(3): L222-L228
62. **Green KJ, Jones JC.** Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *The FASEB Journal*, **1996**, 10(8): 871-881
63. **Greene LS.** Asthma and oxidant stress: nutritional, environmental, and genetic risk factors. *Journal of the American College of Nutrition*, **1995**, 14(4): 317-324
64. **Gregor MF, Hotamisligil GS.** Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of Lipid Research*, **2007**, 48(9): 1905-1914
65. **Groskreutz DJ, Babor EC, Monick MM, Varga SM, Hunninghake GW.** Respiratory syncytial virus limits α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) phosphorylation to maintain translation and viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, **2010**, 285(31): 24023-24031

66. **Gulden M, Jess A, Kammann J, Maser E, Seibert H.** Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radical Biology and Medicine*, **2010**, 49(8): 1298-1305
67. **Gurer-Orhan H, Orhan H, Suzen S, Puskullu MO, Buyukbingol E.** Synthesis and evaluation of *in vitro* antioxidant capacities of some benzimidazole derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2006**, 21(2): 241-247
68. **Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY.** Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, **2005**, 213(1-2): 66-73
69. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, **1990**, 186: 1-85
70. **Halliwell B, Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, **2004**, 142(2): 231-255
71. **Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D.** Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cell*, **2000**, 5(5): 897-904
72. **Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Stojdl DF.** An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*, **2003**, 11(3): 619-633
73. **Hassan IH, Zhang MS, Powers LS, Shao JQ, Baltrusaitis J, Rutkowski DT, Monick MM.** Influenza A viral replication is blocked by inhibition of the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) stress pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **2012**, 287(7): 4679-4689
74. **Hayes ME, Wallace GA, Grongsaard P, Bischoff A, George DM, Miao W, Roth GP.** Discovery of small molecule benzimidazole antagonists of the chemokine receptor CXCR3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18(5): 1573-1576
75. **Haze K, Okada T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K.** Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochemical Journal*, **2001**, 355(1): 19-28
76. **Heijink IH, de Bruin HG, van den Berge M, Bennink LJ, Brandenburg SM, Gosens R, Postma DS.** Role of aberrant WNT signalling in the airway epithelial response to cigarette smoke in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, **2013**, 68(8): 709-716
77. **Hetz C.** The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2012**, 13(2): 89-102
78. **Hicks W, Hall L, Sigurdson L, Stewart C, Hard R, Winston J, Lwebuga-Mukasa J.** Isolation and characterization of basal cells from human upper respiratory epithelium. *Experimental Cell Research*, **1997**, 237(2): 357-363
79. **Hill AT, Bayley D, Stockley RA.** The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **1999**, 160(3): 893-898
80. **Hillery AM, Lloyd AW, Swarbrick J.** Drug delivery and targeting: for pharmacists and pharmaceutical scientists. *Taylor & Francis*, **2001**, ss: 475
81. **Hirsch I, Weiwad M, Prell E, Ferrari DM.** ERp29 deficiency affects sensitivity to apoptosis via impairment of the ATF6-CHOP pathway of stress response. *Apoptosis*, **2014**, 19(5): 801-815
82. **Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G.** Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *American Journal of Epidemiology*, **2002**, 156(8): 738-746
83. **Hofmann K.** Imidazole and its derivatives part I. Interscience Publishers, New York, **1953**, s: 379
84. **Holgate ST, Roberts G, Arshad HS, Howarth PH, Davies DE.** The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **2009**, 6(8): 655-659
85. **Holtzman MJ, Byers DE, Alexander-Brett J, Wang X.** The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease. *Nature Reviews Immunology*, **2014**, 14(10): 686-698
86. <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/respiratory/passages/bronchi.html>
87. **Hummati S, Hotamisligil GS.** Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circulation Research*, **2010**, 107(5): 579-591

88. **Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, Calverley P.** Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine*, **2010**, 363(12): 1128-1138
89. **Jain SK.** Membrane lipid peroxidation in erythrocytes of the newborn. *Clinica chimica acta*, **1986**, 161(3): 301-306
90. **Jiang J, Yu S, Jiang Z, Liang C, Yu W, Li J, Wang X.** N-acetyl-serotonin protects HepG2 cells from oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014**, Article ID 310504
91. **Johnson LR.** *Essential Medical Physiology*. 3rd Ed., Elsevier Academic Press, USA, **2003**, s. 259-315
92. **Jones CJ.** *Epithelia: Advances in Cell Physiology and Cell Culture*. 1st Ed., Springer Science & Business Media, USA, **1990**, s. 195-233
93. **Jung EJ, Avliyakov NK, Boonthung P, Loo JA, Nel AE.** Pro-oxidative DEP chemicals induce heat shock proteins and an unfolding protein response in a bronchial epithelial cell line as determined by DIGE analysis. *Proteomics*, **2007**, 7(21): 3906-3918
94. **Kapoor A, Sanyal AJ.** Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Clinics in Liver Disease*, **2009**, 13(4): 581-590
95. **Karagöz GE, Acosta-Alvear D, Nguyen HT, Lee CP, Chu F, Walter P.** An unfolded protein-induced conformational switch activates mammalian IRE1. *eLife*, **2017**, 6: e30700
96. **Kastner PE, Casset A, Pons F.** Formaldehyde interferes with airway epithelium integrity and functions in a dose- and time-dependent manner. *Toxicology Letters*, **2011**, 200(1-2): 109-116
97. **Kaufman RJ, Scheuner D, Schröder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM.** The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2002**, 3(6): 411-421
98. **Kaufman RJ.** Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, **2002**, 110(10): 1389-1398
99. **Kawaguchi S, Ng DT.** Sensing ER stress. *Science*, **2011**, 333(6051): 1830-1831
100. **Kelsen SG, Duan X, Ji R, Perez O, Liu C, Merali S.** Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: a proteomic approach. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **2008**, 38(5): 541-550
101. **Kenche H, Baty CJ, Vedagiri K, Shapiro SD, Blumental-Perry A.** Cigarette smoking affects oxidative protein folding in endoplasmic reticulum by modifying protein disulfide isomerase. *The FASEB Journal*, **2013**, 27(3): 965-977
102. **Kerimov I, Ayhan-Kilcigil G, Can-Eke B, Altanlar N, İscan M.** Synthesis, antifungal and antioxidant screening of some novel benzimidazole derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2007**, 22(6): 696-701
103. **Kim H, Liu X, Kobayashi T, Conner H, Kohyama T, Wen FQ, Rennard SI.** Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **2004**, 31(5): 483-490
104. **Kim YW, West XZ, Byzova TV.** Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Journal of Molecular Medicine*, **2013**, 91(3): 323-328
105. **Kincaid MM, Cooper AA.** ERADicate ER stress or die trying. *Antioxidants & Redox Signaling*, **2007**, 9(12): 2373-2387
106. **Kirkham PA, Rahman I.** Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*, **2006**, 111(2): 476-494
107. **Kirkham PA, Spooner G, Ffoulkes-Jones C, Calvez R.** Cigarette smoke triggers macrophage adhesion and activation: role of lipid peroxidation products and scavenger receptor. *Free Radical Biology and Medicine*, **2003**, 35(7): 697-710
108. **Kirkham PA, Spooner G, Rahman I, Rossi AG.** Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is compromised by matrix proteins modified by cigarette smoke and lipid peroxidation products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2004**, 318(1): 32-37
109. **Knight DA, Holgate ST.** The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, **2003**, 8(4): 432-446
110. **Ko FW, Tam W, Wong TW, Chan DP, Tung AH, Lai CK, Hui DS.** Temporal relationship between air pollutants and hospital admissions for chronic obstructive pulmonary disease in Hong Kong. *Thorax*, **2007**, 62(9): 780-785
111. **Koblizek V, Tomsova M, Cermakova E, Papousek P, Pracharova S, Mandalia RA, Ruta J.** Impairment of nasal mucociliary clearance in former smokers with stable chronic obstructive pulmonary disease relates to the presence of a chronic bronchitis phenotype. *Rhinology*, **2011**, 49(4): 397-406

112. **Kode A, Yang SR, Rahman I.** Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Respiratory Research*, **2006**, 7(1): 132
113. **Kohn K.** Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. *Journal of Biochemistry*, **2009**, 147(1): 27-33
114. **Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M, Weaver TE.** Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2008**, 178(8): 838-846
115. **Koritzinsky M, Magagnin MG, van den Beucken T, Seigneuric R, Savelkoul K, Dostie J, Lambin P.** Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. *The EMBO Journal*, **2006**, 25(5): 1114-1125
116. **Koval M.** Tight junctions, but not too tight: fine control of lung permeability by claudins. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **2009**, 297(2): L217-L218
117. **Kubo K, Oda K, Kaneko T, Satoh H, Nohara A.** Synthesis of 2-(4- Fluoroalkoxy-2-pyridyl) methyl] sulfinyl]-1H-benzimidazoles as antiulcer agents. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1990**, 38(10): 2853-2858
118. **La Maestra S, De Flora S, Micale RT.** Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **2015**, 218(1): 117-122
119. **Lal-Nag M, Morin PJ.** The claudins. *Genome Biology*, **2009**, 10(8): 235
120. **Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH.** XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*, **2003**, 23(21): 7448-7459
121. **Lee AS.** The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends in Biochemical Sciences*, **2001**, 26(8): 504-510
122. **Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Nel A.** Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environmental Health Perspectives*, **2003**, 111(4): 455-460
123. **Li Y, Wang Y, Liu X.** The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. *Clinical and Developmental Immunology*, **2012**, Article ID 791392
124. **Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Walter P.** IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*, **2007**, 318(5852): 944-949
125. **Lin JH, Walter P, Yen TB.** Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **2008**, 3: 399-425
126. **Liu W, Tan X, Shu L, Sun H, Song J, Jin P, Jia X.** Ursolic acid inhibits cigarette smoke extract-induced human bronchial epithelial cell injury and prevents development of lung cancer. *Molecules*, **2012**, 17(8): 9104-9115
127. **Liu Y, Di YP.** Effects of second hand smoke on airway secretion and mucociliary clearance. *Frontiers in Physiology*, **2012**, 3: 342
128. **Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P.** *Molecular Cell Biology*, 6th ed., New York: W. H. Freeman, **2008**, 1296
129. **Loose M, Hudel M, Zimmer KP, Garcia E, Hammerschmidt S, Lucas R, Pillich H.** Pneumococcal hydrogen peroxide-induced stress signaling regulates inflammatory genes. *The Journal of Infectious Diseases*, **2014**, 211(2): 306-316
130. **Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Buist S.** Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *European Respiratory Journal*, **2006**, 27(2): 397-412
131. **Lu B, Kerepesi L, Wisse L, Hitchman K, Meng QR.** Cytotoxicity and gene expression profiles in cell cultures exposed to whole smoke from three types of cigarettes. *Toxicological Sciences*, **2007**, 98(2): 469-478
132. **Ma Y, Hendershot LM.** Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278(37): 34864-34873
133. **MacNee W.** Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **2005**, 2(1): 50-60
134. **Mak JCW.** Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **2008**, 12(4): 368-374
135. **Malhotra D, Thimmulappa R, Vij N, Navas-Acien A, Sussan T, Merali S, Tudor R.** Heightened endoplasmic reticulum stress in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the

- role of Nrf2-regulated proteasomal activity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2009**, 180(12): 1196-1207
136. **Malhotra JD, Kaufman RJ.** Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidants & Redox Signaling*, **2007a**, 9(12): 2277-2294
 137. **Malhotra JD, Kaufman RJ.** The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **2007b**, 18(6): 716-731
 138. **Mannino DM, Buist AS.** Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *The Lancet*, **2007**, 370(9589): 765-773
 139. **Mannino DM, Kiri VA.** Changing the burden of COPD mortality. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, **2006**, 1(3): 219-233
 140. **Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F.** Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *European Respiratory Journal*, **2008**, 32(4): 962-969
 141. **Marieb EN, Mallatt J, Wilhelm PB.** *Human Anatomy*, 7th ed., Pearson Benjamin Cummings. **2013**
 142. **Masaki H, Okano Y, Sakurai H.** Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H₂O₂ or ultraviolet B light. *Archives of Dermatological Research*, **1998**, 290(3): 113-118
 143. **Mathers CD, Loncar D.** Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, **2006**, 3(11): e442
 144. **Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA.** Regulation of the transcription factors NF- κ B and AP-1 by redox changes. *Chemico-Biological Interactions*, **1994**, 91(2-3): 91-100
 145. **Min T, Bodas M, Mazur S, Vij N.** Critical role of proteostasis-imbalance in pathogenesis of COPD and severe emphysema. *Journal of Molecular Medicine*, **2011**, 89(6): 577-593
 146. **Mohora M, Greabu M, Totan A, Mitrea N, Battino M.** Redox-sensitive signaling factors and antioxidants. *Farmacia*, **2009**, 57(4): 399-410
 147. **Morse D, Rosas IO.** Tobacco smoke-induced lung fibrosis and emphysema. *Annual Review of Physiology*, **2014**, 76: 493-513
 148. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65(1-2): 55-63
 149. **Nakano H, Inoue T, Kawasaki N, Miyataka H, Matsumoto H, Taguchi T, Satoh T.** Synthesis of benzimidazole derivatives as antiallergic agents with 5-lipoxygenase inhibiting action. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1999**, 47(11): 1573-1578
 150. **Narasimhan B, Sharma D, Kumar P.** Benzimidazole: a medicinally important heterocyclic moiety. *Medicinal Chemistry Research*, **2012**, 21(3): 269-283
 151. **Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R.** Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*, **2008**, 153(1): 6-20
 152. **Nicholas B, Skipp P, Mould R, Rennard S, Davies DE, O'Connor CD, Djukanovic R.** Shotgun proteomic analysis of human-induced sputum. *Proteomics*, **2006**, 6(15): 4390-4401
 153. **Nievers MG, Schaapveld RQ, Sonnenberg A.** Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biology*, **1999**, 18(1): 5-17
 154. **Niewoehner DE, Lokhnygina Y, Rice K, Kuschner WG, Sharafkhaneh A, Sarosi GA, Kesten S.** Risk indexes for exacerbations and hospitalizations due to COPD. *Chest*, **2007**, 131(1): 20-28
 155. **Nikola JK, Stampfli MR.** Cigarette smoke-induced inflammation and respiratory host defense: Insights from animal models. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **2012**, 25(4): 257-262
 156. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **1979**, 95(2): 351-358
 157. **Ozars R, Tahan V, Turkmen S, Talay F, Besirli K, Aydin S, Cetinkaya A.** Changes in malondialdehyde levels in bronchoalveolar fluid and serum by the treatment of asthma with inhaled steroid and beta2-agonist. *Respirology*, **2000**, 5(3): 289-292
 158. **Ozcan U, Ozcan L, Yilmaz E, Düvel K, Sahin M, Manning BD, Hotamisligil GS.** Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Molecular Cell*, **2008**, 29(5): 541-551
 159. **Parker J, Sarlang S, Thavagnanam S, Williamson G, O'Donoghue D, Villenave R, Skibinski G.** A 3-D well-differentiated model of pediatric bronchial epithelium demonstrates unstimulated morphological differences between asthmatic and nonasthmatic cells. *Pediatric Research*, **2010**, 67(1): 17-22
 160. **Pastor M, Nogal A, Molina-Pinelo S, Melendez R, Romero-Romero B, Mediano M, Paz-Ares L.** Identification of oxidative stress related proteins as biomarkers for lung cancer and chronic obstructive

- pulmonary disease in bronchoalveolar lavage. *International Journal of Molecular Sciences*, **2013**, 14(2): 3440-3455
161. **Patil C, Walter P.** Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Current Opinion in Cell Biology*, **2001**, 13(3): 349-355
 162. **Perjes A, Kubin AM, Konyi A, Szabados S, Cziraki A, Skoumal R, Szokodi I.** Physiological regulation of cardiac contractility by endogenous reactive oxygen species. *Acta Physiologica*, **2012**, 205(1): 26-40
 163. **Pillai SG, Ge D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, Need AC, Ruppert A.** A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genetics*, **2009**, 5(3): e1000421
 164. **Postma DS, Kerkhof M, Boezen HM, Koppelman GH.** Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: common genes, common environments? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2011**, 183(12): 1588-1594
 165. **Prescott E, Bjerg AM, Andersen PK, Lange P, Vestbo J.** Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study. *European Respiratory Journal*, **1997**, 10(4): 822-827
 166. **Pryor WA, Stone K.** Oxidants in cigarette smoke radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1993**, 686(1): 12-27
 167. **Rahman I, Adcock IM.** Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *European Respiratory Journal*, **2006**, 28(1): 219-242
 168. **Rahman I.** Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, **2002**, 1(3): 291-315
 169. **Rahman I.** The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD. *Treatments in Respiratory Medicine*, **2005**, 4(3): 175-200
 170. **Reader JR, Tepper JS, Schelegle ES, Aldrich MC, Putney LF, Pfeiffer JW, Hyde DM.** Pathogenesis of mucous cell metaplasia in a murine asthma model. *The American Journal of Pathology*, **2003**, 162(6): 2069-2078
 171. **Reynold A, Panettieri Jr.** Effects of corticosteroids on structural cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **2004**, 1(3): 231-234
 172. **Rigas B, Sun Y.** Induction of oxidative stress as a mechanism of action of chemopreventive agents against cancer. *British Journal of Cancer*, **2008**, 98(7): 1157-1160
 173. **Roberson EC, Tully JE, Guala AS, Reiss JN, Godburn KE, Pociask DA, Anathy V.** Influenza Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Caspase-12-Dependent Apoptosis, and c-Jun N-Terminal Kinase-Mediated Transforming Growth Factor- β Release in Lung Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **2012**, 46(5): 573-581
 174. **Roche WR, Montefort S, Baker J, Holgate ST.** Cell adhesion molecules and the bronchial epithelium. *American Review of Respiratory Disease*, **1993**, 148: 79-82
 175. **Rogers DF.** Mucociliary dysfunction in COPD: effect of current pharmacotherapeutic options. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **2005**, 18(1): 1-8
 176. **Rogers DF.** The airway goblet cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2003**, 35(1): 1-6
 177. **Ron D, Walter P.** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2007**, 8(7): 519-529
 178. **Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P.** ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *Journal of Cell Biology*, **2014**, 204(6): 869-879
 179. **Salvi SS, Barnes PJ.** Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet*, **2009**, 374(9691): 733-743
 180. **Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H.** Tight junctions and human diseases. *Medical Electron Microscopy*, **2003**, 36(3): 147-156
 181. **Schröder M, Kaufman RJ.** ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2005a**, 569(1-2): 29-63
 182. **Schröder M, Kaufman RJ.** The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry*, **2005b**, 74: 739-789
 183. **Serrano-Mollar A.** Alveolar epithelial cell injury as an etiopathogenic factor in pulmonary fibrosis. *Archivos de Bronconeumologia*, **2012**, 48(2): 2-6

184. **Shah DI, Sharma M, Bansal Y, Bansal G, Singh M.** Angiotensin II–AT1 receptor antagonists: Design, synthesis and evaluation of substituted carboxamido benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 43(9): 1808-1812
185. **Shen X, Zhang K, Kaufman RJ.** The unfolded protein response-a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **2004**, 28(1-2): 79-92
186. **Shi Y, Wang F, He J, Yadav S, Wang H.** Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. *Toxicology Letters*, **2010**, 196(1): 21-27
187. **Shin K, Fogg VC, Margolis B.** Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2006**, 22: 207-235
188. **Shingalapuri RV, Hosamani KM, Keri RS, Hugar MH.** Derivatives of benzimidazole pharmacophore: Synthesis, anticonvulsant, antidiabetic and DNA cleavage studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 45(5): 1753-1759
189. **Shohaimi S, Welch A, Bingham S, Luben R, Day N, Wareham N, Khaw KT.** Area deprivation predicts lung function independently of education and social class. *European Respiratory Journal*, **2004**, 24(1): 157-161
190. **Sim MO, Jang JH, Lee HE, Jung HK, Cho HW.** Antioxidant effects of Geranium nepalense ethanol extract on H₂O₂-induced cytotoxicity in H9c2, SH-SY5Y, BEAS-2B, and HEK293. *Food Science and Biotechnology*, **2017**, 26(4): 1045-1053
191. **Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS.** Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*, **2011**, 334(6059): 1086-1090
192. **Sobotta MC, Barata AG, Schmidt U, Mueller S, Millonig G, Dick TP.** Exposing cells to H₂O₂: a quantitative comparison between continuous low-dose and one-time high-dose treatments. *Free Radical Biology and Medicine*, **2013**, 60: 325-335
193. **Somborac-Bacura A, Van der Toorn M, Franciosi L, Slebos DJ, Zanic-Grubisic T, Bischoff R, van Oosterhout AJ.** Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress response and proteasomal dysfunction in human alveolar epithelial cells. *Experimental Physiology*, **2013**, 98(1): 316-325
194. **Sont JK, Willems LN, Bel EH, van Krieken JHJ, Vandenbroucke JP, Sterk PJ, AMPUL Study Group.** Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long-term treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **1999**, 159(4): 1043-1051
195. **Soriano JB, Rodriguez-Roisin R.** Chronic obstructive pulmonary disease overview: epidemiology, risk factors, and clinical presentation. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **2011**, 8(4): 363-367
196. **Spina D.** Epithelium smooth muscle regulation and interactions. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **1998**, 158(2): 141-145
197. **Spurzem JR, Rennard SI.** Pathogenesis of COPD. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, **2005**, 26(2): 142-153
198. **St Johnston D, Ahringer J.** Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell*, **2010**, 141(5): 757-774
199. **St Johnston D, Sanson B.** Epithelial polarity and morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, **2011**, 23(5): 540-546
200. **Stone V, Donaldson K.** Nanotoxicology: signs of stress. *Nature Nanotechnology*, **2006**, 1(1): 23
201. **Styskala J, Styskalova L, Slouka J, Hajduch M.** Synthesis of 2-aryl-4-(benzimidazol-2-yl)-1, 2-dihydro [1, 2, 4] triazino-[4, 5-a] benzimidazol-1-one derivatives with preferential cytotoxicity against carcinoma cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 43(3): 449-455
202. **Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A.** Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*, **2006**, 7(9): 880-885
203. **Tamimi A, Serdarevic D, Hanania NA.** The effects of cigarette smoke on airway inflammation in asthma and COPD: therapeutic implications. *Respiratory Medicine*, **2012**, 106(3): 319-328
204. **Thannickal VJ, Fanburg BL.** Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **2000**, 279(6): 1005-1028
205. **Thompson AB, Robbins RA, Romberger D, Sisson JH, Teschler H, Rennard SI.** Immunological functions of the pulmonary epithelium. *European Respiratory Journal*, **1995**, 8(1): 127-149
206. **Tkacova R, Kluchova Z, Joppa P, Petrasova D, Molcanyiova A.** Systemic inflammation and systemic oxidative stress in patients with acute exacerbations of COPD. *Respiratory Medicine*, **2007**, 101(8): 1670-1676

207. **Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH.** The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, **2008**, 8(9): 663-674
208. **Tran I, Ji C, Ni I, Min T, Tang D, Vij N.** Role of cigarette smoke-induced aggresome formation in chronic obstructive pulmonary disease-emphysema pathogenesis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **2015**, 53(2): 159-173
209. **Trapnell BC, Chu CS, Paakko PK, Banks TC, Yoshimura K, Ferrans VJ, Crystal RG.** Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the respiratory tract of normal individuals and individuals with cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1991**, 88(15): 6565-6569
210. **Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P.** Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, **2000**, 101(3): 249-258
211. **Tsao SM, Yin MC.** Antioxidative and antiinflammatory activities of asiatic acid, glycyrrhizic acid, and oleanolic acid in human bronchial epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2015**, 63(12): 3196-3204
212. **Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M.** Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation*, **2002**, 105(10): 1155-1157
213. **Tsukita S, Furuse M.** Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *The Journal of Cell Biology*, **2000**, 149(1): 13-16
214. **Tuder RM, Janciauskiene SM, Petrache I.** Lung disease associated with α 1-antitrypsin deficiency. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **2010**, 7(6): 381-386
215. **Urano F, Bertolotti A, Ron D.** IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, **2000**, 113(21): 3697-3702
216. **Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D.** Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, **2000**, 287(5453): 664-666
217. **Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic MM, Mazur M.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **2006**, 160(1): 1-40
218. **Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Ten Hacken NHT.** Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*, **2004**, 59(8): 713-721
219. **Van der Vlies D, Eward HW, Post JA, Celis JE, Wirtz KW.** Endoplasmic reticulum resident proteins of normal human dermal fibroblasts are the major targets for oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, **2002**, 366(3): 825-830
220. **Van Rijt SH, Keller IE, John G, Kohse K, Yildirim AO, Eickelberg O, Meiners S.** Acute cigarette smoke exposure impairs proteasome function in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **2012**, 303(9): 814-823
221. **Walter P, Ron D.** The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, **2011**, 334(6059): 1081-1086
222. **Wang Y, Bai C, Li K, Adler KB, Wang X.** Role of airway epithelial cells in development of asthma and allergic rhinitis. *Respiratory Medicine*, **2008**, 102(7): 949-955
223. **Warburton D, Perin L, DeFilippo R, Bellusci S, Shi W, Driscoll B.** Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **2008**, 5(6): 703-706
224. **Waris G, Ahsan H.** Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, **2006**, 5: 14
225. **Weitnauer M, Mijosek V, Dalpke AH.** Control of local immunity by airway epithelial cells. *Mucosal immunology*, **2016**, 9(2): 287-298
226. **Wordley J, Walters S, Ayres JG.** Short term variations in hospital admissions and mortality and particulate air pollution. *Occupational and Environmental Medicine*, **1997**, 54(2): 108-116
227. **Wright DT, Cohn LA, Li H, Fischer B, Li CM, Adler KB.** Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. *Environmental Health Perspectives*, **1994**, 102(10): 85-90
228. **Wu J, Kaufman RJ.** From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death and Differentiation*, **2006**, 13(3): 374-384
229. **Wu J, Shi Y, Asweto CO, Feng L, Yang X, Zhang Y, Sun Z.** Fine particle matters induce DNA damage and G2/M cell cycle arrest in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Environmental Science and Pollution Research*, **2017**, 24(32): 25071-25081

230. **Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC.** Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of Clinical Investigation*, **2005**, 115(10): 2656-2664
231. **Xue X, Piao JH, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Kojima Y, Mori K, Nakano H.** Tumor necrosis factor α (TNF α) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNF α . *Journal of Biological Chemistry*, **2005**, 280(40): 33917-33925
232. **Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, Okamura M, Du S, Kasai A, Kitamura M.** Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *Journal of Biological Chemistry*, **2008**, 283(7): 4252-4260
233. **Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K.** A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Developmental Cell*, **2003**, 4(2): 265-271
234. **Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K.** XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, **2001**, 107(7): 881-891.
235. **Yoshida H.** ER stress and diseases. *The FEBS Journal*, **2007**, 274(3): 630-658
236. **Yoshida T, Tuder RM.** Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiological Reviews*, **2007**, 87(3): 1047-1082
237. **Yu G, Zeng X, Wang H, Hou Q, Tan C, Xu Q, Wang H.** 14, 15-epoxyeicosatrienoic Acid suppresses cigarette smoke extract-induced apoptosis in lung epithelial cells by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **2015**, 36(2): 474-486
238. **Zaheer RS.** Selective transcriptional down-regulation of human rhinovirus-induced production of CXCL10 in airway epithelial cells via the MEK1 pathway effects on interferon regulatory factor-1. Degree of Doctor of Philosophy, University of Calgary, Department of Cardiovascular and Respiratory Sciences, Alberta, **2010**.
239. **Zhang K, Kaufman RJ.** From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, **2008**, 454(7203): 455-462
240. **Zhang K, Kaufman RJ.** Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279(25): 25935-25938
241. **Zhang L, Wang Y.** Tauroursodeoxycholic acid Alleviates H₂O₂-Induced Oxidative Stress and Apoptosis via Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Dose-Response*, **2018**, 16(3): 1559325818782631
242. **Zhornik EV, Baranova LA, Strukova AM, Loiko EN, Volotovskii ID.** ROS induction and structural modification in human lymphocyte membrane under the influence of carbon nanotubes. *Biophysics*, **2012**, 57(3): 325-331
243. **Zhu Y, Ehre C, Abdullah LH, Sheehan JK, Roy M, Evans CM, Davis CW.** Munc13-2^{-/-} baseline secretion defect reveals source of oligomeric mucins in mouse airways. *The Journal of Physiology*, **2008**, 586(7): 1977-1992

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Kayseri’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kayseri’de tamamladı. 2005 yılında Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2009 yılında mezun oldu. 2012 yılında Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2014 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyokimya ve Genetik Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı.

